



دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات

دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست ، گروه زیست شناسی دریا

رساله برای دریافت درجه دکتری در رشته زیست شناسی دریا (Ph.D.)

گرایش: جانوران دریا

عنوان:

بررسی اثرات علف کش اکسادیازون بر شاخص های فیزیولوژیک ، بیوشیمیایی و میزان تخریب DNA

بچه ماهیان کپور دریای خزر (*Cyprinus carpio*)

استاد راهنما:

دکتر حسین عمادی

استادان مشاور:

دکتر شهلا جمیلی

دکتر علی ماشینچیان

نگارش:

سیده عسل زنجانی

زمستان ۱۳۹۷

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



معاونت پژوهش و فن آوری

به نام خدا

مشور اخلاق پژوهش

بیاری از خداوند سبحان و اعتقاد به این که عالم محضر خداست و بهواره ناظر بر اعمال انسان و به منظور پاس داشت مقام بلند دانش و پژوهش و نظریه اهمیت جایگاه دانشگاه در اعتلای فرهنگ و تمدن بشری، مادیان و انبویان و اعضاء هیأت علمی و اصدای دانشگاه آزاد اسلامی متعهد می گردیم اصول زیر را در انجام فعالیت های پژوهشی مد نظر قرار داده و از آن تخطی نکنیم:

- ۱- اصل حقیقت جویی: تلاش در راستای پی جویی حقیقت و وفاداری به آن و دوری از هرگونه پنهان سازی حقیقت
- ۲- اصل رعایت حقوق: التزام به رعایت کامل حقوق پژوهشگران و پژوهشگران (انسان، حیوان و نبات) و سایر صاحبان حق.
- ۳- اصل مالکیت مادی و معنوی: تعهد به رعایت مصالح ملی و در نظر داشتن پیشبرد و توسعه کشور در کلیه مراحل پژوهش
- ۴- اصل منفعت ملی: تعهد به رعایت مصالح ملی و در نظر داشتن پیشبرد و توسعه کشور در کلیه مراحل پژوهش
- ۵- اصل رعایت انصاف و امانت: تعهد به اجتناب از هرگونه جانبداری غیر علمی و حفاظت از اموال، تجهیزات و منابع در اختیار
- ۶- اصل رازداری: تعهد به صیانت از اسرار و اطلاعات محرمانه افراد، سازمان ها و کشورهای افراد و نهادهای مرتبط با تحقیق.
- ۷- اصل احترام: تعهد به رعایت حریم ها و حرمت ها در انجام تحقیقات و رعایت جانب تقد و خودداری از هرگونه حرمت شکنی.
- ۸- اصل ترویج: تعهد به رواج دانش و اشاعه نتایج تحقیقات و انتقال آن به بکاران علمی و دانشجویان به غیر از مواردی که منع قانونی دارد.
- ۹- اصل برائت: التزام به برائت جویی از هرگونه رفتار غیر حرفه ای و اعلام موضع نسبت به کسانی که حوزه علم و پژوهش را به مثابه های غیر علمی می آلائند.



دانشگاه آزاد اسلامی
واحد علوم و تحقیقات
تعهذنامه اصالت رساله یا پایان نامه

اینجانب سیده عسل زنجانی دانش آموخته مقطع دکتری در رشته زیست شناسی دریا که در تاریخ ۹۷/۱۱/۶ از پایان نامه خود با عنوان بررسی اثرات علف کش اکسادیازون بر شاخص های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و میزان تخریب DNA بچه ماهیان کپور دریای خزر (*Cyprinus carpio*) با کسب نمره و درجه عالی دفاع نموده ام بدینوسیله متعهد می شوم:

۱ این پایان نامه / رساله حاصل تحقیق و پژوهش انجام شده توسط اینجانب بوده و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران (اعم از پایان نامه، کتاب، مقاله و...) استفاده نموده ام، مطابق ضوابط و رویه موجود، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آن را در فهرست مربوطه ذکر و درج کرده ام.

۲ این پایان نامه / رساله قبلاً برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح، پائین تر یا بالاتر) در سایر دانشگاه ها و مؤسسات آموزش عالی ارائه نشده است.

۳ چنانچه بعد از فراغت از تحصیل، قصد استفاده و هرگونه بهره برداری اعم از چاپ کتاب، ثبت اختراع و... از این پایان نامه داشته باشم، از حوزه معاونت پژوهشی واحد مجوزهای مربوطه را اخذ نمایم.

۴ چنانچه در هر مقطع زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن را می پذیرم و واحد دانشگاهی مجاز است با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت ابطال مدرک تحصیلی ام هیچ گونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی:

سیده عسل زنجانی

تاریخ و امضاء:

تقدیم به :

این مجموعه را به پاس تعبیر عظیم شان از کلمه ایثار و به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شهامت می گراید و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند ، با افتخار تقدیم می نمایم به محضر ارزشمند

پدر عزیزم که همیشه تکیه گاه و حامی من در تمام طول زندگی بوده ،

و مادر عزیزم ، سنگ صبوری که الفبای زندگی را به من آموخت .

والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم .

چرا که این دو وجود بعد از پروردگار مایه ی هستی ام هستند و نفس خیر و دعای روح پرورشان همواره بدرقه ی راهم بوده است.

و همچنین شادی بخش زندگی ام ، برادر عزیزم

که در تمام این مسیر متحمل زحماتم بود و همواره همراه من در مواجهه با مشکلات است و وجودش مایه دلگرمی من است.

حال این برگ سبزی است تحفه ی درویش ، تقدیم عزیزانم به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان.

قدردان زحماتتان هستم.

سپاسگزاری :

شکر خدا که هرچه طلب کردم از خدا بر منتهای همت خود کامران شدم.

نخستین سپاس و ستایش از آن خداوندی است که بنده ی کوچکش را در دریای بیکران اندیشه ، قطره ای ساخت تا وسعت آن را از دریچه ی اندیشه های ناب آموزگاران بزرگ به تماشا بنشیند. لذا اکنون که در سایه سار بنده نوازی هایش رساله ی حاضر به انجام رسیده است بر خود لازم میدانم تا مراتب سپاس را از بزرگوارانی به جا آورم که اگر دست یاریگرشان نبود ، هرگز این رساله به انجام نمی رسید.

ابتدا از استاد اندیشمند ، با کمالات و شایسته ، جناب آقای دکتر عمادی که با حسن خلق و صبوری بسیار ، زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشتند ، کمال قدردانی را دارم.

از استاد ارزشمند و دلسوز ، سرکار خانم دکتر جمیلی ، مشاور محترم ، کمال سپاس را دارم که به دلیل راهنمایی های بی چشم داشتی که داشتند ، بسیاری از سختی های مسیر را آسانتر نمودند.

و همچنین استاد گرانقدر و محترم ، جناب آقای دکتر ماشینچیان که در کمال سعه صدر از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت مشاوره ی این رساله را بر عهده داشتند ، بسیار سپاسگزارم.

سپاس آخر را به پدر و مادر و برادر عزیزم تقدیم می کنم که در تمام عرصه های زندگی یار و یاور من بودند و با حمایت های همه جانبه راه را هموار ساختند تا مراتب تحصیلی و نیز این رساله را به نحوه احسن به اتمام برسانم .

پروردگارا حسن عاقبت ، سلامت و سعادت را برای تمام آنان مقدر بفرما.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده	۱
فصل اول: کلیات تحقیق	۲
۱-۱- مقدمه	۳
۲-۱- آلودگی اکوسیستم‌های آبی	۵
۳-۱- عملکرد اختصاصی	۵
۴-۱- اثر علف‌کش‌ها بر ماهی‌ها	۷
۵-۱- آفت‌کش‌ها به‌عنوان آلاینده‌های آب	۸
۶-۱- تأثیرات زیستی آفت‌کش‌ها بر آبزیان	۸
۷-۱- علف‌کش اکسادیازون	۱۰
۸-۱- مکانیسم عمل اکسادیازون	۱۱
۹-۱- آسیب ساختاری DNA	۱۲
۱۰-۱- فرایندهای جذب، تغییر و دفع ماده سمی (توکسیکوکیتیک)	۱۴
۱۱-۱- دسته‌بندی میزان سمیت	۱۵
۱۲-۱- دریای خزر	۱۶
۱۳-۱- ماهی کپور دریای خزر	۱۸
۱۴-۱- بیان مسئله اساسی تحقیق به‌طورکلی	۲۰
۱۵-۱- اهمیت و ضرورت انجام تحقیق	۲۱
۱۶-۱- جنبه جدید بودن و نوآوری در تحقیق	۲۱
۱۷-۱- اهداف تحقیق	۲۱
۱۸-۱- سؤالات تحقیق	۲۱
۱۹-۱- فرضیه‌های تحقیق	۲۲
فصل دوم: مروری بر ادبیات و پیشینه تحقیق	۲۳
فصل سوم: مواد و روش‌ها	۲۹
۱-۳- محل اجرا و آماده‌سازی مکان تحقیق	۳۰
۲-۳- روش‌های اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکی، شیمیایی و فیزیکی شیمیایی آب	۳۰
۳-۳- تهیه غلظت‌های تحت‌کشنده اکسادیازون	۳۰

۳-۴- آزمون سمیت حاد	۳۰
۳-۵- آزمون سمیت مزمن	۳۱
۳-۶- ارزیابی بالینی و رفتاری	۳۱
۳-۷- نمونه برداری و خون گیری	۳۱
۳-۸- سنجش فاکتورهای سلولی خون	۳۲
۳-۹- روش تهیه نمونه های بافتی	۳۲
۳-۱۰- مراحل تهیه برش از بافت ها	۳۳
۳-۱۱- بررسی هیستوپاتولوژی	۳۴
۳-۱۲- بررسی میزان تخریب DNA سنجش کامت (Comet assay)	۳۴
۳-۱۳- آزمون کامت قلبی برای بررسی میزان آسیب DNA (Alkaline Comet Assay)	۳۵
۳-۱۴- تجزیه و تحلیل آماری	۳۶
فصل چهارم: تجزیه و تحلیل داده ها	۳۷
۴-۱- نتایج فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب	۳۸
۴-۲- نتایج آزمون سمیت حاد	۳۸
۴-۳- نتایج آزمون سمیت مزمن	۳۸
۴-۴- بررسی اثرات علف کش اکسادیازون بر رشد و مرگ و میر بچه ماهی کپور دریای خزر	۴۰
۴-۵- سنجش فاکتورهای سلولی خون	۴۱
۴-۵-۱- تغییرات میزان گلوکز	۴۳
۴-۵-۲- تغییرات آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT)	۴۴
۴-۵-۳- تغییرات آنزیم اسپارتات ترانس آمیناز (AST)	۴۵
۴-۵-۴- تغییرات آلکالین فسفاتاز (ALP)	۴۶
۴-۵-۵- تغییرات پروتئین کل	۴۷
۴-۵-۶- تغییرات آلبومین (ALB)	۴۸
۴-۵-۷- تغییرات کلسترول	۴۹
۴-۶- تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی خون	۵۰
۴-۷- نتایج هیستوپاتولوژی	۵۱
۴-۷-۱- مقاطع بافتی تهیه شده از بافت های تیمار شاهد	۵۱

۴-۷-۲- مقاطع بافتی تهیه شده از بافت‌های تیمار ۱	۵۳
۴-۷-۳- مقاطع بافتی تهیه شده از بافت‌های تیمار ۲	۵۸
۴-۷-۴- مقاطع بافتی تهیه شده از بافت‌های تیمار ۳	۶۷
۴-۸- سنجش تخریب DNA	۷۶
۴-۹- بحث	۷۸
۴-۹-۱- سمیت حاد	۷۸
۴-۹-۲- سمیت مزمن	۷۹
۴-۹-۲-۱- فاکتورهای بیوشیمیایی خون	۷۹
۴-۹-۲-۲- هیستوپاتولوژی	۸۱
۴-۹-۲-۳- سنجش تخریب DNA	۸۶
فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات	۸۹
۵-۱- نتیجه گیری کلی	۹۰
۵-۲- پیشنهادات	۹۱
فهرست منابع	Error! Bookmark not defined.
فهرست منابع انگلیسی	۹۲
چکیده انگلیسی	۱۰۰

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱- طبقه‌بندی میزان سمیت مواد نسبت به غلظت ماده سمی بر اساس سیستم وزنی استاندارد آمریکا.....	۱۵
جدول ۱-۴- فاکتورهای کیفی آب.....	۳۷
جدول ۲-۴- بررسی میزان غلظت کشندگی ۵۰ درصد علف کش اکسادیازون.....	۳۷
جدول ۳-۴- فاکتورهای سلولی خون در دوره اول آزمایش.....	۴۰
جدول ۴-۴- فاکتورهای سلولی خون در دوره دوم آزمایش.....	۴۰
جدول ۵-۴- فاکتورهای سلولی خون در دوره سوم آزمایش.....	۴۱
جدول ۶-۴- تاثیر سم اکسادیازون بر روی فاکتورهای خونی ماهی کپور در یایی خزر پس از گذشت ۳۰ روز.....	۴۹

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱- تصویری از سمیت یک علف‌کش روی گیاه و ماهی	۶
شکل ۲-۱- تصویری گرافیکی از منابع، مسیرهای رهایی و تخریب علف‌کش‌ها در آب‌های سطحی ...	۷
شکل ۳-۱- ساختار شیمیایی اکسادیازون	۱۰
شکل ۴-۱- ماهی کپور <i>Cyprinus carpio</i>	۱۸
شکل ۱-۳- تلفات ۱۰۰ درصدی در دوزهای بالای علف‌کش اکسادیازون	۳۰
شکل ۲-۳- مراحل خونگیری	۳۱
شکل ۳-۳- مراحل تهیه مقاطع بافتی	۳۳
شکل ۱-۴- علایم کالبد گشایی در سمیت مزمن	۳۸
شکل ۲-۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت‌های مختلف در تیمار شاهد	۵۱
شکل ۳-۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت آبشش در تیمار ۱	۵۲
شکل ۴-۴- نتایج هیستوپاتولوژی حاصل از مطالعه بافت کبد در تیمار ۱	۵۳
شکل ۵-۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت کلیه در تیمار ۱	۵۵
شکل ۶-۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت عضله در تیمار ۱	۵۶
شکل ۷-۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت طحال در تیمار ۱	۵۷
شکل ۸-۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت آبشش در تیمار ۲	۵۹
شکل ۹-۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت کبد در تیمار ۲	۶۱
شکل ۱۰-۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت کلیه در تیمار ۲	۶۳
شکل ۱۱-۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت عضله در تیمار ۲	۶۴
شکل ۱۲-۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت طحال در تیمار ۲	۶۶
شکل ۱۳-۴- نتایج هیستوپاتولوژی حاصل از مطالعه بافت آبشش در تیمار ۳	۶۷
شکل ۱۴-۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت کبد در تیمار ۳	۶۹
شکل ۱۵-۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت کلیه در تیمار ۳	۷۱
شکل ۱۶-۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت عضله در تیمار ۳	۷۳
شکل ۱۷-۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت طحال در تیمار ۳	۷۴
شکل ۱۸-۴- DNA گلبول قرمز ماهی کپور وحشی تیمار شاهد	۷۵

فهرست نمودارها

صفحه	عنوان
۳۹	شکل ۴-۱- اثرات علف کش اکسادیازون بر طول و وزن بچه ماهی کپور دریای خزر.....
۴۲	شکل ۴-۲- میزان گلوکز خون در دوره‌های مختلف قرار گرفتن ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف اکسادیازون.....
۴۳	شکل ۴-۳- میزان آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) خون در دوره‌های مختلف قرار گرفتن ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف اکسادیازون.....
۴۴	شکل ۴-۴- میزان آنزیم اسپارتات ترانس آمیناز (AST) خون در دوره‌های مختلف قرار گرفتن ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف اکسادیازون.....
۴۵	شکل ۴-۵- میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) خون در دوره‌های مختلف قرار گرفتن ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف اکسادیازون.....
۴۶	شکل ۴-۶- میزان پروتئین کل خون در دوره‌های مختلف قرار گرفتن ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف اکسادیازون.....
۴۷	شکل ۴-۷- میزان آلبومین (ALB) در دوره‌های مختلف قرار گرفتن ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف اکسادیازون.....
۴۸	شکل ۴-۸- میزان کلسترول دوره‌های مختلف آزمایش.....
۷۶	شکل ۴-۹- اثرات غلظت‌های اکسادیازون (۱، ۵/۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بر نوسانات آسیب DNA (بصورت % DNA دنباله) در سلول‌های خون ماهی کپور وحشی در روز ۶۰ پس از شروع آزمایش

چکیده

در این پژوهش، تاثیر علف کش اکسادiazon روی بچه ماهی کپور وحشی (*Cyprinus carpio*) دریای خزر با میانگین وزن اولیه ۱۵ گرم تحت تیمارهای ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر به مدت ۹۶ ساعت (سمیت حاد) و همچنین در ۳۰ روز (سمیت مزمن) میزان رشد، فاکتورهای بیوشیمیایی، فاکتورهای خونی، میزان تخریب DNA گلبول قرمز و تغییرات بافت شناسی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس مطالعه صورت گرفته میزان سمیت حاد علف کش اکسادiazon ۳/۹ میلی گرم در لیتر به دست آمد. در ماهیان تحت تاثیر علف کش اکسادiazon میزان رشد (وزن نهایی (WG)، رشد ویژه (SGR) و شاخص وضعیت (CF) کاهش و ضریب تبدیل (FCR) افزایش یافته بود. همچنین میزان آنزیم های کبدی (ALT, AST, ALP) و میزان گلوکز را افزایش و پروتئین کل، کلسترول و آلبومین به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0.05$). در ماهی های تحت تاثیر قرار گرفته بیشترین میزان تخریب DNA در غلظت تحت کشنده ۲ میلی گرم در لیتر ۲۸/۴ درصد و سپس بترتیب در غلظت های ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر ۲۱/۳ و ۲۲/۹ درصد مشاهده شد که به طوری معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود ($P < 0.05$). علاوه بر این، میزان گلبول های سفید، گلبول های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین کاهش یافت و میزان آلبومین، گلوکز، میزان پروتئین کل به طوری معنی داری افزایش یافته بود ($P < 0.05$). همچنین تفاوت معنی داری در میزان MCV، MCHC و MCH گروه های تیمار و گروه کنترل دیده نشد. علف کش اکسادiazon باعث ایجاد تغییرات بافت شناسی از جمله هیپرپلازی سلولهای اپیتلیوم پوششی لاملای ثانویه، نفوذ سلولهای التهابی و نکروز در بافت آبشش شد. در بافت کبد تغییرات چربی در سلولهای کبدی، نفوذ بافت فیروز و هایپرپلازی مجاری صفراوی دیده شد. در بافت کلیه پرخونی، نکروز سلولهای اپیتلیوم پوششی لوله های ادراری و تخریب سلولهای بافت بینابینی کلیه دیده شد. همچنین در بافت عضلانی باعث ایجاد تغییرات در میوفیبریل ها، نکروز و تخریب سلولهای بینابینی شد. تغییر در اندازه و تعداد مراکز ملانوماکروفاژ در بافت های، کلیه، طحال و کبد در گروه های تحت تیمار مشاهده شد. این تحقیق نشان داد که علف کش اکسادiazon به میزان زیادی برای ماهی کپور وحشی سمی است و قرار گرفتن در معرض این علف کش منجر به عوارض جانبی می شود.

کلمات کلیدی: اکسادiazon، کپور دریای خزر، هایپرپلازی، تخریب DNA، شاخص های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، آسیب بافتی (کلیه، کبد، عضله و آبشش)

فصل اول: کلیات تحقیق

دریای خزر دریای فرصت‌ها و چالش‌ها است و نقش آن در شکل‌دهی سیمای اکولوژیک سرزمین‌های اطراف آن در چند دهه اخیر، همگام با توجه بشر به خطراتی که محیط‌زیست سیاره زمین را در معرض تهدید قرار داده، مورد شناسایی و توجه فراوان قرار گرفته است. هرچند تمام آب‌ها و مناطق دیگر جهان یک اکولوژی واحد به شمار می‌روند ولی نظر به شرایط تاریخی و موقعیت جغرافیایی، دریای مازندران علاوه بر کارکردهای دوگانه یادشده از یک اکولوژی واحد برخوردار است (فاضلی، ۱۳۹۰).

امروزه با توجه به توسعه صنعت و پیشرفت کشاورزی، سموم کشاورزی متعددی تولیدشده که با شیوه‌های مختلف در مزارع به کار می‌روند که البته اثرات سویی نیز بر اکوسیستم اطراف باقی می‌گذارند. آفت‌کش‌ها فرآورده‌هایی برای حفظ نباتات هستند که در مدیریت آفات و بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز کاربرد دارند. کاربرد گسترده انواع سموم شیمیایی با طیف وسیع و پایداری زیاد طی دهه‌های اخیر، بشر را با بحران متعدد زیست‌محیطی روبرو ساخته است و موجب به خطر افتادن انسان‌ها و سایر موجودات زنده، آلودگی آب‌و‌خاک و منابع غذایی، نابودی حشرات مفید و سایر دشمنان طبیعی و مقاومت فزاینده نسبت به این سموم گردیده است. ازجمله محیط‌هایی که در معرض خطرات استفاده از سموم هستند، محیط‌های آبی می‌باشند. آبریان هم به خاطر زندگی دائمی در این محیط‌ها پیوسته در معرض تماس با این آلاینده‌ها می‌باشند. سموم علف‌کش یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های اکوسیستم‌های آبی محسوب می‌شوند و معمولاً از طریق مصرف در مزارع، باعث بروز آسیب‌های شدید در جوامع آبریان و اکوسیستم‌ها می‌شوند (van der Oost et al., 2003). مبحث سم‌شناسی از دو جنبه پزشکی و زیست‌محیطی (اکوتوکسیکولوژی) مدنظر می‌باشد که در بخش دوم با فون و فلور موجود در محیط، جمعیت‌ها، جوامع و نیز بوم‌سازگان حمایت‌کننده آن‌ها سروکار دارد و اغلب برای بیان اثرات آلاینده‌های شیمیایی بر فون و فلور طبیعی تعریف می‌شود. دراین بین، اغلب از ماهیان به‌عنوان موجودات شاخص برای مطالعات اکوتوکسیکولوژیک استفاده می‌شود، زیرا ماهیان پرتعدادترین و متنوع‌ترین مهره‌داران ساکن انواع بوم‌سازگان‌های آبی می‌باشند و در زنجیره غذایی نقش‌های متعددی را بازی می‌کنند، همچنین به‌عنوان محل تجمع مواد سمی شناخته‌شده‌اند، بعلاوه وجود اغلب ماهیان به‌عنوان مصرف‌کنندگان ثانویه یا نهایی از جنبه سلامت انسانی حائز اهمیت می‌باشد (Al-Sabti and Metcalfe, 1995). بنابراین، اهمیت استفاده از ماهی به‌عنوان شاخص زیستی اثرات آلودگی در حال افزایش است و می‌تواند در تشخیص زودهنگام مشکلات محیط‌زیست آبی مفید واقع شود (Jha, 2008).

سموم کشاورزی که توسط بشر ساخته می‌شوند و به‌عنوان انواع آفت‌کش و علف‌کش مورد استفاده قرار می‌گیرند، دارای خواص ویژه‌ای هستند که باعث بقاء در محیط و در زنجیره‌های غذایی مختلف بوده باعث تأثیرات منفی می‌شوند. از آنجاکه سواحل جنوبی دریای خزر به‌عنوان قطب مهم کشاورزی کشور محسوب

می‌شوند، استفاده از سموم کشاورزی، علف‌کش‌ها و قارچ‌کش‌ها بسیار بالا می‌باشد. علف‌کش‌ها بالاترین میزان مصرف را در میان آفت‌کش‌ها در کشاورزی دارند. در سال ۲۰۰۷ در سراسر جهان ۲/۴ میلیون تن آفت‌کش مورد استفاده قرار گرفت که ۴۰ درصد آن یعنی چیزی حدود ۹۵۰ میلیون کیلوگرم سهم علف‌کش‌ها بود. علف‌کش‌ها در کشاورزی، جنگلداری و دیگر فعالیت‌هایی نظیر کنترل علف‌ها در مناطق شهری و راه‌ها استفاده می‌شوند که بیشترین فعالیت را در کشاورزی دارند. تعدادی از محصولات دست‌کاری‌های ژنتیکی^۱ (GM) تولید شده‌اند که استفاده از آن‌ها در آینده بیشتر خواهد شد. همچنین محصولات دست‌کاری‌های ژنتیکی که مورد استفاده قرار می‌گیرند از علف‌کش گلیفوزات^۲ استفاده می‌کنند (Duke and Powles., 2008). اما برخی دیگر از آفت‌کش‌ها نیز هستند که در کلاس‌هایی دیگر قرار می‌گیرند همانند مشابه اکسین^۳ و دیگر محصولات آن‌ها گروهی از هورمون‌های گیاهی مانند ایندول استیک اسید (IAA) که رشد و نمو گیاهان را با غلظت پایین خود تنظیم می‌نمایند و این خود از طریق ساخت، الحاق و تجزیه تنظیم می‌شود. علف‌کش‌های اکسینی مصنوعی مانند فنوکسی کربوکسیلیک اسیدها (مانند توفوردی و امسیپیا)، بنزویک اسیدها (مانند دایکامبا)، پیریدین کربوکسیلیک اسیدها (مانند کلوپیرالید، پیکلورام) و کوینولین کربوکسیلیک اسیدها (مانند کوین کلوراک)، به آسانی می‌توانند تا رسیدن به حد گیاه‌سوزی در گیاهان تجمع یابند (Mortensen et al., 2012). افزایش استفاده از محصولات اصلاح‌شده ژنتیکی منجر به افزایش ورود این مواد به اکوسیستم خاکی می‌شود و سبب آلودگی موجودات آبی و محیط‌های دیگر می‌شود.

از جمله این سموم می‌توان به علف‌کش اکسادیازون اشاره کرد که با فرمول بسته $O_3C_{15}H_{18}Cl_2N_2$ و نام تجاری رونستار استفاده می‌شود. از تأثیرات منفی آلاینده‌ها روی آبزیان می‌توان به آسیب‌های ژنتیکی (آسیب به DNA از طریق رادیکال‌ها و صدمات کروموزومی)، تأثیر روی تولیدمثل (هم آوری، کاهش انرژی تولیدمثل)، تأثیر روی رشد (فاکتورهای وضعیت)، تأثیر روی رفتار (مهاجرت، فرار و رفتارهای تولیدمثل) و تأثیر روی سیستم ایمنی (اختصاصی و غیراختصاصی) اشاره کرد (Lawrence and Hemingway, 2003). یکی از نخستین و مهم‌ترین اثرات ناشی از آلاینده‌های مختلف بر جانداران آبی، آسیب وارده به محتوای ژنتیکی است. آلاینده‌ها با ورود به پیکره یک موجود زنده می‌توانند به ماکرو مولکول‌های باارزشی مثل اسیدهای نوکلئیک (DNA) آسیب رسانده و موجبات تخریب آن‌ها را فراهم نمایند که در ادامه، فرایندهای مخرب آبشاری را در پی خواهد داشت. ترکیبات سمی گوناگون نظیر آفت‌کش‌ها به علت خاصیت

^۱ Genetically Modified

^۲ Glyphosate

^۳ auxin mimic, 2,4-D

ژنوتوکسیک خود می‌توانند با اتصال به رشته DNA، موجب شکستگی تک رشته و یا دو رشته‌ای مولکول DNA شوند (Frenzilli *et al.*, 2000). همچنین رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) ناشی از آن‌ها می‌توانند با اکسید کردن ترکیبات ساختاری DNA (به‌ویژه بازهای آلی) موجب شکست مولکول DNA شوند (Peña-Llopis *et al.*, 2003).

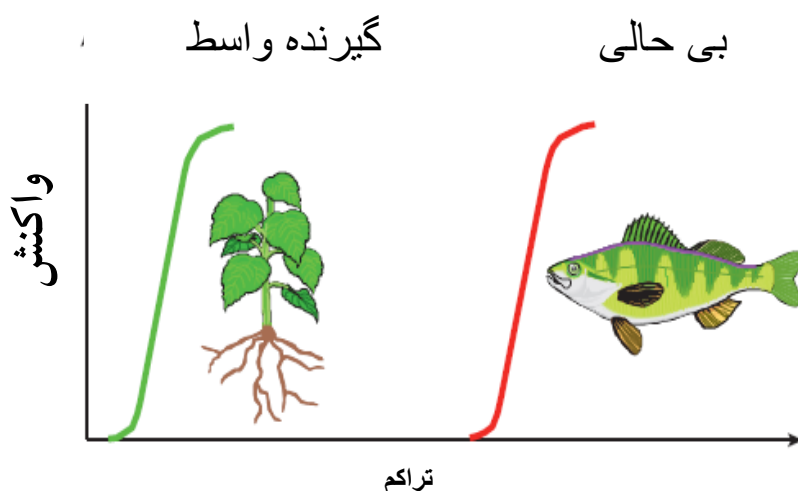
۲-۱- آلودگی اکوسیستم‌های آبی

آلودگی محیط‌زیست یک معضل مهم جهانی است. زمانی که عوامل آلاینده آب ذکر می‌شوند، عامل کشاورزی در صدر قرار دارد که مرتباً در حال شدت گرفتن است. البته توسعه کشاورزی برای پاسخگویی به نیاز روزافزون غذا، امری اجتناب‌ناپذیر است اما در کنار آن، پیامدهایی ناخواسته و نامطلوب برای زندگی انسان‌ها و محیط‌زیست رخ می‌دهند که نیازمند چاره‌جویی و اصلاح می‌باشند. ازجمله مهم‌ترین پیامدهای نامطلوب توسعه کشاورزی، آلودگی آب‌های سطحی و زیرزمینی است که در نتیجه عوامل متعددی مانند فرسایش خاک و کاربرد بی‌رویه کود و سموم پدید می‌آید. در ایران هم مواردی از این دست را می‌توان یافت که گاه سبب بروز مشکلات جدی برای ساکنین محلی شده‌اند. به‌رحال چنانچه راه کارهای مناسب مدیریتی به اجرا درنیایند، در آینده شاهد معضلات بزرگ‌تر و پیچیده‌تری همچون مرگ و میر آبزیان، گسترش بیشتر بیماری‌های ناشی از آب آلوده و تخریب تالاب‌ها و رودخانه‌ها خواهیم بود (Ongley, 1996).

۳-۱- عملکرد اختصاصی

به‌استثنای زیست‌کش‌هایی (biocides) مانند گاز کلره در ضدعفونی کردن آب و نگهداری چوب به کار می‌رود و یا پنتاکلروفنل؛ بیشتر آفت‌کش‌های مورد استفاده در کشاورزی برای برخی گروه‌ها از موجودات کشنده هستند و برای برخی دیگر نیستند. در اغلب موارد هدف آن‌ها آفات خاصی می‌باشد که این امر منجر به عمل اختصاصی آن‌ها می‌شود. این موضوع نیز برای علف‌کش‌هایی که برای کنترل جمعیت گیاهی طراحی شده‌اند نیز صدق می‌کند. برای مثال مهارکننده‌های فتوسنتتیک مثل اوره و تریازین (triazine) هدفشان شبکه‌های فتوسنتتیک می‌باشد که در حیوانات وجود ندارد (Devine *et al.*, 1993). در نتیجه حیوانات نسبت به گیاهان کمتر به علف‌کش‌ها حساس هستند. اما تمام مواد شیمیایی در غلظت‌های بالا سمی هستند پس علف‌کش‌ها می‌توانند از طریق مکانیسمی متفاوت برای حیوانات نیز سمی باشند و این مکانیسم بر اساس اولین خط نکرز می‌باشد. در ماهی‌ها اولین آسیب مشخص به‌صورت بی‌حالی و مرگ ناگهانی دیده می‌شود که هیچ علامتی ماننده افزایش تنفس، شنا کردن ناگهانی و سریع، و خونریزی ندارد (Veith and Broderius, 1990). تمام مواد شیمیایی آلی غیر قطبی دارای حالتی کلی می‌باشند که غشای سلولی را هدف قرار می‌دهند. در صورت وجود غلظت‌های بالا از ماده سمی این فرآیند می‌تواند در هر موجود زنده‌ای ایجاد شود. این پدیده نیز در ماهیان به علت سطح تماس وسیع آبشش با محیط خارج و نقش حیاتی آن در تنفس

به فراوانی رخ می‌دهد. بنابراین با اینکه علف‌کش‌ها به‌طور معمول سمیت کمتری برای حیوانات دارند اما در غلظت‌های بالا می‌توانند برای حیوانات نیز سمی باشند (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱- تصویری از سمیت یک علف‌کش روی گیاه و ماهی. مکانیسم عمل در این دو گروه از موجودات متفاوت می‌باشد (Tierney *et al.*, 2013)

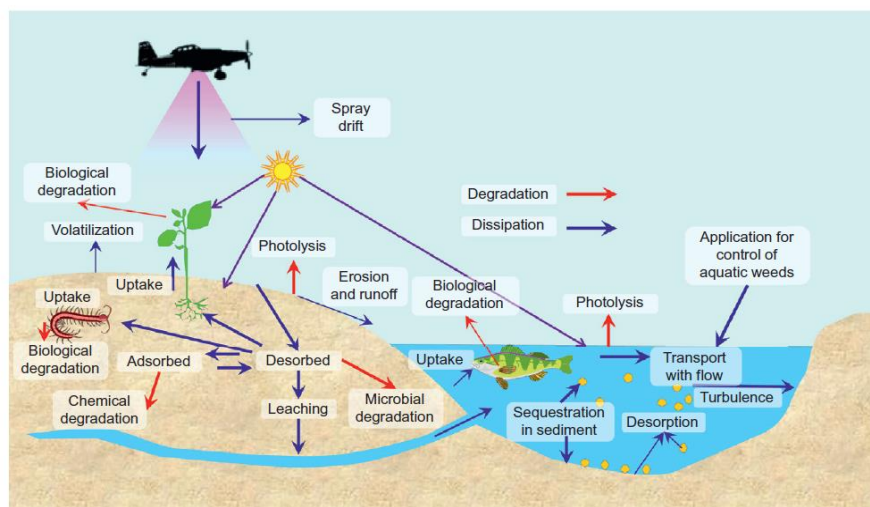
برخی علف‌کش‌ها با عملکردی کلی می‌توانند با ماهی و دیگر حیوانات نیز مرتبط باشند. این‌ها شامل موادی می‌باشند که با مسیرهای متابولیک، فعل و انفعالاتی ایجاد می‌کنند که منجر به تولید گونه‌های اکسیژنی فعال (ROS) و دیگر رادیکال‌های آزاد می‌شوند که سبب ایجاد صدماتی در سلول می‌شوند. اما این حالات کمتر به علت استفاده از علف‌کش‌ها رخ می‌دهد و فقط واکنشی است که در غلظت‌های بالا رخ می‌دهد. آفت‌کش‌های تجاری که به محیط وارد می‌شوند معمولاً با موادی دیگر ترکیب شده‌اند که به‌واسطه آن‌ها عملکردی اختصاصی بروز می‌دهند. این مواد تحت عنوان فرمولانت^۱ (هر ماده افزوده‌شده به فرمولاسیون آفت‌کش به‌جز ماده مؤثر که این مواد ممکن است شامل حامل یا سایر موادی باشند که فعالیت بیولوژیک یا ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی فرمولاسیون را بهبود بخشند) شناخته می‌شوند. از آنجا که اغلب علف‌کش‌ها باید از طریق آوند چوبی و آوند آبکشی گیاه مورد هدف حمل شوند، حلالیت بیشتری نسبت به سایر آفت‌کش‌ها همانند حشره‌کش‌ها در آب دارند. بنابراین اغلب علف‌کش‌ها نیاز به اضافه کردن مواد پراکنده‌کننده به فرمولانت برای سهولت در کاربرد ندارند. اما برخی علف‌کش‌ها مانند گلیوفوسزیت بسیار قطبی می‌باشند و از کوتیکول واکسی گیاهان عبور نمی‌کنند. در این موارد سورفاکتانت‌ها برای افزایش نفوذپذیری به لایه کوتیکولی و بافت گیاهی، به فرمولانت اضافه می‌شوند (Solomon and Thompson, 2003). سورفاکتانت‌ها

^۱ Formulant

یا مواد فعال سطحی می‌توانند در غشای آبخش‌ها تداخل ایجاد کنند و دچار سمیت شوند (Konnecker *et al.*, 2011). سمیت ناشی از سورفاکتانت می‌تواند از سمیت ماده فعال بیشتر باشد. سورفاکتانت‌ها در مصارف داخلی و صنعتی کاربرد گسترده‌ای دارند باینکه مقدار استفاده آن‌ها در فورمولانت بسیار کم می‌باشد ولی مصرف سالیانه آن‌ها در جهان ۱۳ میلیارد کیلوگرم بوده است (Levinson, 2008). به‌طورکلی استفاده از مواد فعال سطحی ممکن است خطراتی را برای ماهیان ایجاد کند اما در برخی سناریوها استفاده از علف‌کش‌های فورمولانت می‌تواند برای ماهی‌ها مهم باشد. موارد بحث شده در بالا مربوط به سمیت مستقیم علف‌کش‌ها می‌باشد درحالی‌که علف‌کش‌ها می‌توانند ماهی‌ها را به‌طور غیرمستقیم تحت تأثیر قرار دهند به‌طور مثال با از بین بردن گیاهانی که به‌عنوان منبع غذایی و یا محیط زندگی برای ماهی‌ها کاربرد دارند. برای مثال ماهی آمور سفید منحصر از گیاهان تغذیه می‌کند و ماهی کپور معمولی روی گیاهان تخم ریزی می‌کند.

۱-۴- اثر علف‌کش‌ها بر ماهی‌ها

علف‌کش‌ها را می‌توان به‌صورت مستقیم به آب‌ها برای از بین بردن علف‌های سطحی افزود و یا می‌توان از روش‌های دیگر آن‌ها را به آب‌های سطحی افزود (تصویر ۱-۲). رسوبات ناشی از سم‌پاشی کردن زمین‌های مجاور آب‌ها یکی از مسیرهای بالقوه ورود مواد به آب‌ها می‌باشد. از عمده‌ترین راه‌های آلودگی ماهیان به علف‌کش‌ها می‌توان به‌اضافه کردن علف‌کش‌ها به زمین‌های کاشت برنج و یا کنترل گیاهان آبی اشاره کرد. باین‌حال، این استفاده‌ها بخشی از عملیات مدیریت آفات و اثرات غیر هدفمند است که توسط کشاورزان و دیگر افراد برای استفاده از آفت‌کش‌ها در آب‌های سطحی در نظر گرفته می‌شود. این محصولات می‌توانند سبب آلودگی در آب‌های سطحی شوند اما این اثرات در برخی مواقع با استفاده از بافرها در محصولات مورد استفاده برای اسپری هوایی و یا زمینی می‌تواند این آلودگی را تا حدی کاهش دهد. اسپری مستقیم روی درختان می‌تواند یکی از منابع ورود سموم به آب‌های سطحی باشد.



شکل ۱-۲- تصویری گرافیکی از منابع، مسیرهای رهایی و تخریب علف‌کش‌ها در آب‌های سطحی (Tierney *et al.*, 2013)

پس از ورود علف‌کش‌ها به محیط، این مواد به صورت تدریجی تجزیه می‌شوند (شکل ۱-۲). دو اصطلاح (Dissipation and dissipation) فرآیندهای مختلفی را بازگو می‌کنند و قابل استفاده به جای یکدیگر نیستند. پراکندگی (Dissipation) توصیف‌کننده حرکت علف‌کش‌ها از مکانی به مکان دیگر می‌باشد. این نقل مکان می‌تواند توسط حرکت قطرات آب، تبخیر، حرکت رواناب صورت گیرد و یا توسط ارگانسیم‌های خاک جذب شود. تجزیه (degradation) توصیف‌کننده تغییر حالت علف‌کش‌ها از یک فرم مولکولی خاص به فرم مولکولی دیگر می‌باشد. این عمل (degradation) می‌تواند توسط فرآیندهای شیمیایی مختلفی مثل هیدرولیز و یا اکسیداسیون، فرآیندهای فیزیکی مثل فتولیز و فرآیندهای بیولوژیک میکروبیوتا (گونه‌های میکرو ارگانسیم)^۱ گیاهان و حیوانات صورت بگیرد. مواد حاصله از تجزیه ترکیبات اولیه به مراتب سمیت کمتری دارند و ادامه این مسیر در نهایت منجر به تبدیل شدن سموم اولیه به مواد معدنی می‌شود و ترکیباتی مثل گاز کربنیک، کلرور سدیم، فسفات و آب تولید می‌شود.

۱-۵- آفت‌کش‌ها به عنوان آلاینده‌های آب

واژه آفت‌کش واژه‌ای مرکب و دربرگیرنده کلیه مواد شیمیایی است که برای کشتن و کنترل آفات مورد استفاده قرار می‌گیرند. درزمینه کشاورزی، این مواد شامل علف‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها، قارچ‌کش‌ها، کرم‌کش‌ها^۲ و جوندہ‌کش‌ها^۳ (سموم کشنده جانوران مهره‌دارجونده) می‌باشد. در سال‌های اخیر، استفاده گسترده از آفت‌کش‌ها روند رو به رشد نگرانی را ایجاد نموده است و آلودگی محیط‌زیست به یکی از معضلات اصلی بشر تبدیل شده است (Zhu et al., 2011). در ایران نیز مصرف این سموم در مزارع کشاورزی - بخصوص استان‌های شمالی که دارای منابع آبی طبیعی نسبتاً زیاد و متنوعی هستند- به فراوانی صورت می‌گیرد. در بین سموم کشاورزی مورد استفاده بیشترین مصرف مربوط به حشره‌کش‌ها است. سپس به ترتیب علف‌کش‌ها، قارچ‌کش‌ها و کنه‌کش‌ها در رده‌های بعدی قرار دارند. بین حشره‌کش‌ها، بیشترین مصرف مربوط به دیازینون، سپس سوین و اندوسولفان می‌باشد. حشره‌کش‌های گوزایتون، اتیون و دورسبان در جایگاه‌های بعدی قرار دارند (وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۸۲).

۱-۶- تأثیرات زیستی آفت‌کش‌ها بر آبزیان

اگرچه مطالعات در خصوص اثرات بیولوژیک آفت‌کش‌ها در طول سال‌های گذشته افزایش یافته است و اثرات منفی این سموم بر روی ماهیان از نظر پارامترهای مختلفی از جمله بیوشیمیایی، بافت‌شناسی، رفتاری،

^۱ microbiota

^۲ Nematocides

^۳ Rodenticides

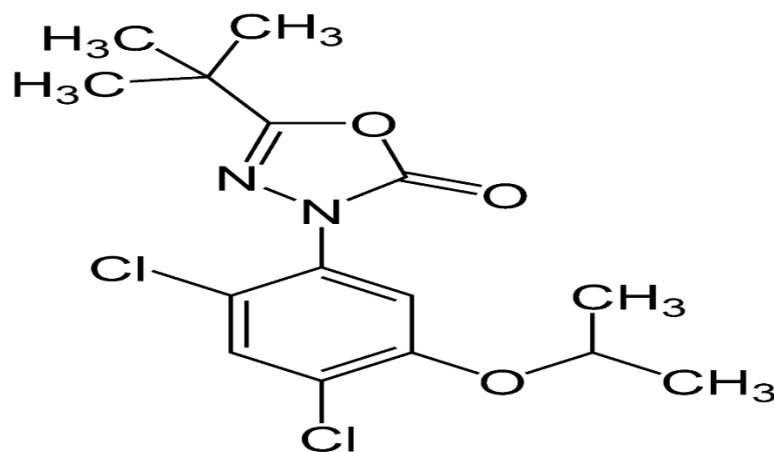
رشد و تولید مثل ارزیابی شده‌اند (Zhu et al., 2011)، اما لازم است تا فاکتورهای دیگری از قبیل آسیب به DNA برای ارزیابی عواقب ناشی از قرار گرفتن در معرض علف‌کش‌ها مورد استفاده قرار گیرد (Mitchelmore and Chipman, 1998b). به‌طور کلی عوارض و اثرات یک ماده سمی از سطوح تحت سلولی و سلولی شروع شده و نهایتاً می‌تواند کل اکوسیستم و پس از آن مجموعه بیوسفر را تحت تأثیر قرار دهد (Lee and Steinert, 2003). آلودگی ناشی از آفت‌کش‌ها در اکوسیستم‌های آبی، به‌عنوان علت تغییرات در پویایی جمعیت چندین گونه ماهی در سطح جهان شناخته شده است. برای مثال اثرات منفی ناشی از مواجهه با سموم مختلف آفت‌کش بر جمعیت‌های وحشی ماهی گامبوزیا (*Gambusia holbroki*)، ماهی تون دریای شمال (*Thunnus thynnus*)، مداکا (*Oryzias latipes*)، کفشک معمولی (*Solea solea*)، ماهی خاویاری سفید (*Acipenser transmontanus*)، تیلاپای نیل (*Oreochromis nilotica*) و ماهی قزل آلا (قهوه‌ای) (*Salmo trutta*) گزارش شده است. البته عوامل دیگر نظیر، صید بیش از حد، بیماری، تغییر در الگوهای باروری و یا از دست دادن زیستگاه نیز می‌تواند به این وضعیت کمک کند (Candioti et al., 2010).

اغلب آفت‌کش‌ها عوامل سنتتیکی هستند که تازه به محیط راه پیدا کرده‌اند و بنابراین اثرات آن‌ها بر سیستم‌های زیستی کمتر بررسی شده و قابل پیش‌بینی نیست. بعلاوه نتایج مربوط به اثرات ژنوتوکسیک این مواد اغلب ناقص و گاه متناقض است (Cavalcante et al., 2008). آلاینده‌ها با ورود به پیکره یک موجود زنده می‌توانند به ماکرو مولکول‌های باارزشی مثل پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک آسیب رسانده و موجبات تخریب آن‌ها را فراهم نمایند. یکی از مهم‌ترین اثرات ناشی از آلاینده‌های مختلف بر جانداران آبی، آسیب وارده به محتوای ژنتیکی است. عوارض ناشی از آسیب به محتوای ژنتیکی در آبزیان را می‌توان به‌صورت کاهش رشد، نمو غیرطبیعی و کاهش در میزان بازماندگی لاروها و افراد بالغ مشاهده نمود. برای مثال گزارش‌هایی مبنی بر اختلال باروری در دو گونه ماهی آب شیرین بعد از قرار گرفتن در معرض عوامل ژنوتوکسیک ارائه شده است که نتایج حاکی از ارتباط بین آسیب DNA اسپرم و توسعه و تکامل جنینی لارو ماهی می‌باشد (Devaux et al., 2010). بعلاوه در مطالعه موردی صورت گرفته بر روی جمعیت میگو در یک منطقه آلوده، در مقایسه با ناحیه فاقد آلودگی حاکی از آن بود که میگوهای منطقه آلوده در مقایسه با ناحیه مرجع تراکم و تولید لارو کمتری داشتند و آسیب DNA بالاتری را نشان دادند (Lee and Steinert, 2003). این موضوع در مورد رابطه آسیب ناشی از مواد ژنوتوکسیک روی فاکتور رشد نیز گزارش شده است (Steinert et al., 1998). به‌هر حال رفتار آفت‌کش‌ها در محیط‌های آبی تحت تأثیر عوامل متعددی قرار داشته و از طرفی حساسیت موجودات زنده به آفت‌کش‌های مختلف به شدت با

یکدیگر متفاوت است.

۷-۱- علف کش اکسادیازون

علف کش اکسادیازون با فرمول بسته ی $O_3C_{15}H_{18}Cl_2N_2$ و نام تجاری رونستار، علف کش پیش رویشی است که برای کنترل گیاهان یک ساله پهن برگ و باریک برگ استفاده می شود (شکل ۱-۳). در شمال ایران بیشترین مصرف آن در مزارع برنج، پنبه، سویا و آفتابگردان است. از اکسادیازون بیشتر به صورت مایع ۱۲ درصد و به مقدار ۳/۵ تا ۴ لیتر در هکتار، ۴ تا ۷ روز پس از نشاء برنج استفاده می شود. نیمه عمر آن در خاک ۳ تا ۶ ماه است. LD50 آن برای پستانداران و پرندگان ۱۰ تا ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم و برای برخی آبزیان LC50 (سمیت حاد) آن ۰/۱ تا ۱ میلی گرم در لیتر گزارش شده است. (Washington State Department of Transportation)



شکل ۱-۳- ساختار شیمیایی اکسادیازون

بررسی وجود اکسادیازون در اکوسیستم های آبی

اگرچه این سم در مزارع کشاورزی به ویژه مزارع برنج مورد استفاده قرار می گیرد، وجود مقادیر زیادی از اکسادیازون و محصولات حاصل از متابولیسم آن در آب های سطحی و اکوسیستم های آبی وجود دارد. سرنوشت اکسادیازون در محیط های آبی تحت تأثیر دو فرایند تجزیه میکروبی و تجزیه شیمیایی قرار دارد. این دو فرایند نیز تحت تأثیر شرایط محیطی نظیر pH، دما و مقدار مواد آلی موجود در آب قرار دارند، بطوریکه پایین بودن دمای محیط و pH خشی آب می تواند باعث پایداری اکسادیازون گردد. جذب آفت کش ها توسط رسوبات و مواد آلی در محیط های آبی نیز می تواند نقش مهمی در پایداری آنها و جلوگیری از تجزیه شدن در آب داشته باشد.

تأثیر اکسادیازون بر آبزیان از طریق مهارکننده پروتوپورفیرینوژن اکسیداز (PPO)^۱

^۱ Protoporphyrinogen Oxidase

این علف کش در کمیته مقاومت در برابر علف کش ها (HRAC)^۱ در گروه E است که علف کش پروتوپورفیرینون IX اکسیداز (PROTOX) را مهار می کند که آخرین آنزیم رایج در سنتز کلروفیل می باشد (Stephenson and Solomon, 2007). مسیر بیوسنتز پورفیرین در اکثر موجودات زنده مهم است. محصولات مسیر تولید رنگدانه کلروفیل در گیاهان و همچنین هموگلوبین و میوگلوبین در حیوانات و آنزیم سیتوکروم در اکثر موجودات زنده می باشند. انتخاب این سم برای گیاهان به دلیل کاهش متابولیسم و یا کاهش دفع آن نسبت به حیوانات می باشد. حساس ترین LC ۵۰ برای مهار پروتوپورفیرین اکسیداز به وسیله علف کش ۵ درصد اکسادیازون ۲۴۱ میکرو گرم در لیتر در ماهی بدست آمده است (AL-SABTI U.S. (EPA, 2012).

۸-۱- مکانیسم عمل اکسادیازون

مکانیسم اثر آن به این ترتیب است که باعث تبدیل پروتوپورفیرینون (پیش ساز اصلی کلروفیل) به پروتوپورفیرین می شود. غالباً پس از مصرف، این سم از چند طریق نظیر شستشوی خاک مزارع در اثر بارندگی، نشت پساب های کشاورزی و وزش باد وارد رودخانه ها شده و در نتیجه موجب آلوده شدن بخشی از آب دریا می گردد. با توجه به چرخه زیستی ماهیان نظیر ماهی سفید در بخش های جنوبی دریای خزر، این علف کش در بافت ماهی ها تجمع می یابد و به این ترتیب خساراتی که این سم به جوامع انسانی از طریق مصرف یا حضور آبزیان آلوده می زند کمتر از خساراتی که به محیط و اکوسیستم های آبی به طور مستقیم وارد می کند، نیست.

در این تحقیق، ماهی کپور دریای خزر به علت اینکه گونه ای جزء ماهیان اقتصادی کشور است، از کارگاه های تکثیر و پرورش ماهی کپور دریای خزر وابسته به شیلات ایران تهیه و مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی ماهی کپور دریای خزر یکی از مهم ترین گونه های کپور ماهیان (Cyprinidae) است که نمونه هایی از آن با وزن ۳۰ کیلوگرم هم صید شده است (Berg, 1948).

این ماهی همه چیزخوار است و در آب های کمی گرم و بسترهای شنی زندگی می کند و معمولاً در تمامی حوضه های آبریز ایران پراکنش دارد. در نهایت هرگونه آلودگی که به آب وارد می شود، باعث ایجاد تغییرات در خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژی آن می شود که در سلامت آبزیان و محیط تأثیرگذار است. تأثیر سم اکسادیازون روی شاخص های خونی ماهی کپور معمولی باعث کاهش چشمگیر گلبول های قرمز خونی و ایجاد کم خونی می شود که به علت کاهش سنتز گلبول های قرمز خون در مغز استخوان می باشد. کاهش در تعداد گلبول های قرمز و محتوای هموگلوبین به علت فعالیت مخرب این سم روی بافت اریتروپوئیتیک می باشد که در نتیجه آن ممکن است بقای سلول ها تحت تأثیر قرار گیرد. همچنین با ایجاد اختلال در قابلیت

^۱ Herbicide Resistance Action Committee

نفوذپذیری غشایی و کاهش توانایی گلبول‌های قرمز در جذب اکسیژن، شرایط تنفسی را برای ماهی‌ها دشوار می‌کند (Saravanan et al., 2017).

۹-۱- آسیب ساختاری DNA

در درون هسته یک سلول، تمامیت ساختار مولکولی DNA دائماً در حال تغییر است. تحت شرایط نرمال سلولی، وقوع تغییرات ساختاری ممکن است توسط پروسه‌های فیزیولوژیک ایجاد شود که گذرا است و به سرعت ترمیم می‌شود و یا به بخشی از ساختار پایدار جدید تبدیل می‌شود درحالی‌که قرار گرفتن موجود زنده در معرض ماده ژنوتوکسیک، معمولاً فرآیندهای طبیعی سلولی را بر هم زده و می‌تواند منجر به تغییرات ساختاری DNA شود که در ادامه ممکن است مشکلات بعدی را برای سلول ایجاد کند.

مکانیسم ایجاد آسیب در ساختار DNA

هنگامی‌که به پایش آلاینده‌های ژنوتوکسیک در محیط‌زیست پرداخته می‌شود، درک مکانیسم‌هایی که این ترکیبات می‌توانند به محتوای ژنتیکی آسیب برسانند مهم است. آلاینده‌های متنوعی روی ژنوم تأثیر دارند که اصطلاحاً ژنوتوکسیک^۱ نامیده می‌شوند. مهم‌ترین این آلاینده‌ها شامل پلی آروماتیک‌ها، نیتروآروماتیک‌ها، فلزات سنگین و آفت‌کش‌ها هستند. این ترکیبات سمی به علت خاصیت ژنوتوکسیک خود می‌توانند با اتصال به رشته DNA موجب شکستگی تک رشته و یا دو رشته‌ای مولکول DNA شوند (Frenzilli et al., 2000). همچنین رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) ناشی از آن‌ها می‌توانند با اکسید کردن ترکیبات ساختاری DNA (به‌ویژه بازهای آلی) موجب شکست مولکول DNA شوند (Dogan et al., 2011, Peña-Llopis et al., 2003). برای مثال کربوسولفان با تولید گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) سبب آسیب اکسیداتیو در ارگانسیم‌های آبی می‌شود (Risso-de Faverney et al., 2001) که رابطه مستقیمی با سطح قطعه‌قطعه شدن DNA دارد (Kadirvel et al., 2009, Lafarga-De la Cruz et al., 2008). به نظر می‌رسد آسیب DNA ناشی از مواد ژنوبیوتیک، عمدتاً به صورت تغییرات در ستون فسفات، قند و یا تغییرات پایه‌ای مانند آلکیلایسیون‌ها، پیوندهای متقاطع و یا ایجاد ترکیب‌های اضافی DNA باشد. خاصیت آلکیل‌کنندگی سموم ارگانوفسفره به‌عنوان یک مکانیسم که در آسیب DNA نقش دارند پیشنهاد شده است. بخش فسفر در ساختار آفت‌کش‌ها احتمالاً جانشین خوبی برای حمله نوکلئوفیلیک که منجر به فسفریلاسیون DNA می‌گردد می‌باشد (Colovic et al., 2010). اتم‌های غنی از الکترون در DNA به‌آسانی توسط الکترون‌دوست‌ها مورد حمله قرار گرفته و انتقال متیل، اتیل یا گروه آلکیل باعث فسفریلاسیون یا الکیل دار کردن و در نتیجه اثرات موتاژنتیک یا کلاستورژنیک می‌گردد. شماری از مواد شیمیایی با خاصیت ژنوتوکسیک در آبزیان مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که به چهار دسته قابل تقسیم بندی هستند:

^۱ Genotoxic

مواد شیمیایی که مستقیماً روی DNA اثر می‌گذارند

این مواد نظیر عوامل الکیل دار کننده^۱ مثل MNNG^۲، اتیل متان سولفونات و متیل متان سولفونات برای آسیب رساندن به DNA نیاز به فعال شدن ندارند. بسیاری از این عوامل سبب ایجاد آسیب در سلول‌های ماسل‌ها، قزل‌آلا، قورباغه و کفشک ماهی شده‌اند (Lee and Steinert, 2003). پراکسید هیدروژن و ۴-آمینو بیفنیل مواد شیمیایی دیگری هستند که مستقیماً در DNA سلول‌های ماهیان و بی‌مهرگان دریایی ایجاد آسیب می‌کنند. متابولیت‌های اصلی حشره‌کش‌های مالاتیون یعنی مالاکسون و ایزومر آن ایزومالاتیون نیز در سلول‌های لنفوسیت انسانی آسیب DNA وابسته به غلظت ایجاد کرده‌اند (Blasiak et al., 1999).

مواد شیمیایی که مواد متابولیک حاصله از آن‌ها سبب آسیب به DNA می‌شود

این گروه از مواد قبل از آسیب رسانی به DNA، نیازمند فعال‌سازی متابولیک هستند که اغلب با تولید متابولیت‌های الکتروفیلیک توسط سیستم سیتوکروم P-۴۵۰ در ارتباط هستند و می‌توانند به DNA متصل شده و انواع آسیب‌ها را سبب گردند. یک نمونه benzo(a)pyrene است که توسط سیستم سیتوکروم P-۴۵۰ به یک Arene oxide تبدیل شده و با اتصال به DNA در سلول‌های کبد می‌تواند سبب ایجاد سرطان گردد (Ames, 1983). ماهیان دارای یک سیستم P-۴۵۰ خیلی فعال هستند. اداکت^۳ یا ترکیب اضافی DNA و متابولیت‌های بنزوپیرین (benzo(a)pyrene) در کبد گربه ماهی (*Ictalurus nebulosus*) گزارش شده است (Sikka et al., 1990). Benzo(a)pyrene و nitro-pyrene در سلول‌های کبد قزل‌آلای قهوه‌ای (*S. trutta*) ایجاد آسیب نمودند ولی در سلول‌های خونی آن، این حالت مشاهده نشد که احتمالاً به این دلیل است که گلبول‌های قرمز ماهیان فاقد سیستم فعال‌سازی برای تولید متابولیت‌های این دو ماده شیمیایی برای آسیب DNA می‌باشد.

مواد شیمیایی که سبب تولید گونه‌های باز فعال اکسیژنی (ROS) شده و از این طریق به DNA آسیب می‌رسانند.

^۱ Alkylating agents

^۲ N-methyl-N-nitro-N-nitroso-guanidine

^۳ Adduct

این گروه از مواد شامل ترکیبات نیترو آروماتیک، کینون ها^۱ و فلزات خاص هستند که تولید متابولیک گونه‌های باز فعال اکسیژنی را القا نموده که می‌تواند به DNA آسیب بزند (Di Giulio et al., 1989). یک مثال نیترو فورانتیون است که اثرش در ماسل *Mytilus edulis* و چندین گونه ماهی گزارش شده است (Mitchelmore and Chipman, 1998a).

مواد شیمیایی که از ساخت و ترمیم DNA جلوگیری می‌کنند

موادی که از ساخت DNA جلوگیری می‌کنند نظیر Cytosine arabinoside، Hydroxyurea، اتیدیم بروماید و غیره هستند. (Sedwick et al., 1981). نمونه‌های موادی که از ترمیم DNA جلوگیری می‌کنند آفیدیکولین، نووویوسین و چند فلز سنگین هستند (DiGiuseppe et al., 1990). بازدارنده ترمیم DNA اساساً از عمل یک یا چند DNA پلی مرز جلوگیری می‌کنند و امکان شناسایی ترمیم برشی ناقص را مهیا ساخته که به صورت شکستگی تک رشته DNA نمایان می‌شود. این حالت زمانی که بازدارنده‌های cytosine-β-D- arabinoside و aphidicolin به نرم تن ماسل (*M. edulis*) در معرض آلودگی اضافه شدند مشاهده گردیده است (Steinert et al., 1998). بعلاوه خیلی از مواد نیز از طریق مکانیسم‌های چندگانه آسیب‌های ژنوتوکسیک را ایجاد می‌کنند.

۱-۱۰- فرایندهای جذب، تغیر و دفع ماده سمی (توکسیکوکینتیک)

تمامی فرایندهای فیزیولوژیک و عوامل درگیر در جذب، انتشار، دگرگونی یا تغیر شکل حیاتی^۲ و دفع یک ماده سمی، مراحل توکسیکوکینتیک هستند. برای غلظتی از ماده سمی خورده شده توسط موجود زنده، بخشی از آن وارد جریان خون شده و مقدار باقی‌مانده به صورت ماده زائد از راه مدفوع دفع می‌شود. در صورت تماس مزمن یا دراز مدت، سرانجام غلظت پلاسمایی ماده سمی به میزان وضعیت پایدار^۳ رسیده، یعنی مقدار جذب شده با مقدار دفع شده در واحد زمان برابر می‌شود. به طور معمول در این شرایط با افزایش غلظت پلاسمایی، دفع هم افزایش پیدا می‌کند.

جذب

توانایی جذب ماده شیمیایی برای ایجاد سمیت سیستمیک، ضروری است. بعضی از مواد شیمیایی به آسانی جذب می‌شوند و بعضی دیگر به طور ناقص جذب می‌شوند. سرعت و مقدار جذب ممکن است تحت تأثیر شکل مواد شیمیایی و شیوه مصرف آن باشد.

^۱ quinones

^۲ Biotransformation

^۳ Steady state level

متابولیسم

متابولیسم به عنوان تبدیل زیستی (سوخت و ساز با استفاده از موجودات زنده خیلی ریز) شناخته می شود و یک عامل مهم در تعیین سمیت می باشد. متابولیت ها تولیدات پس از متابولیسم مواد هستند.

پخش

توزیع و انتشار سم ها و متابولیت های سمی در بدن در تعیین بافت هدف و همچنین شدت سمیت اهمیت دارد. عامل اصلی ورود و آسیب رساندن به سلول، میزان حلالیت در چربی است. اگر سم محلول در چربی باشد، به آسانی به غشا سلول نفوذ پیدا می کند. بیشتر سم ها در بدن ذخیره می شوند. بافت چربی، کبد، کلیه و استخوان مهم ترین محل های ذخیره سم ها هستند. جریان خون راه اصلی انتشار سموم است. کلیه اولین عضو ترشح کننده سموم و در ادامه دستگاه گوارش و شش ها به شمار می روند. همچنین سموم ممکن است در عرق، اشک و شیر نیز وجود داشته باشند.

دفع

بیشترین راه دفع سموم از راه کلیه است که در آسیب کلیوی (نارسایی کلیوی) دفع سموم کندتر شده و در نتیجه قدرت سم افزایش می یابد.

۱-۱۱- دسته بندی میزان سمیت

با طبقه بندی ترکیبات با عناوین سمی^۱، بسیار سمی^۲ و یا غیر سمی^۳ امکان طبقه بندی کاربردی و مفیدی از میزان سمیت فراهم خواهد شد. واضح است که سمیت، مقوله ای نسبی است و باید به صورت رابطه نسبی دوز-اثر برای ترکیبات مختلف تعریف شود. هرچند مشخص است که مفهوم سمیت به عنوان پدیده ای نسبی، تنها زمانی صادق است که شیب منحنی های رابطه دوز- پاسخ ترکیبات همانند باشند. جدول (۱-۱) راهنمای مفیدی است که سمیت را بر اساس مقادیر ضروری ماده سمی برای ایجاد آسیب (دوز کشندگی) بر اساس سیستم متریک یا سیستم وزنی استاندارد ایالات متحده آمریکا طبقه بندی می کند. این اطلاعات به دسته بندی سمیت مواد بر اساس وزن بدن کمک خواهد کرد (تبرایی، ۱۳۹۴).

روش دیگر دسته بندی دوزهای کشنده، با مقایسه نسبت میزان کم ترین دوز سمی یک ترکیب به میزان کم ترین دوز مناسب آن انجام می شود، چنان که گاهی برای علایم اولیه غذایی هم انجام شود.

جدول ۱-۱- طبقه بندی میزان سمیت مواد نسبت به غلظت ماده سمی بر اساس سیستم وزنی استاندارد آمریکا (تبرایی، ۱۳۹۵)

^۱ Toxic

^۲ Extremely toxic

^۳ Non toxic

غلظت LD ₅₀	میزان سمیت
کمتر از ۱ میلی گرم در کیلوگرم	بسیار سمی
۱ تا ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم	سمیت بالا
۵۰ تا ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم	سمیت متوسط
۵ تا ۵۰ گرم در کیلوگرم	سمیت کم
۵ تا ۱۵ گرم در کیلوگرم	در عمل غیر سمی
بیش از ۱۵ گرم در کیلوگرم	به نسبت بی ضرر

۱۲-۱- دریای خزر

دریای خزر به همراه دریا‌های آرال، مدیترانه و سیاه، باقیمانده دریای بزرگ "تتیس" می‌باشد. خزر که در نقشه‌های جهان به "کاسپین" (CASPIAN) معروف است، بزرگ‌ترین دریاچه جهان و سومین منبع ذخایر نفت و گاز دنیا می‌باشد که از شمال به روسیه، از جنوب به ایران، از غرب به آذربایجان و از شرق به ترکمنستان و قزاقستان محدود می‌شود و دارای ۱۲۰۴ کیلومتر طول و بین ۲۲۰ تا ۵۵۰ کیلومتر پهنا و ۶۵۰۰ کیلومتر محیط است که از این مقدار ۹۰۰ کیلومتر سواحل ایران، ۸۲۰ کیلومتر سواحل آذربایجان، ۱۴۷۶ کیلومتر سواحل روسیه، ۱۶۴۷ کیلومتر سواحل ترکمنستان و ۱۹۰۰ کیلومتر سواحل قزاقستان می‌باشد (جعفری، ۱۳۹۳). شیب این دریا به سمت ایران (از شمال به جنوب) است، به طوری که عمق آن در شمال بین ۱۰ تا ۱۲ متر، در وسط ۷۷۰ متر و در عمیق‌ترین نقطه جنوبی ۱۰۶۰ متر است.

تاریخچه

دریای خزر که در گذشته به نام‌هایی چون خاواینسکی، دریای هیرکانیان، دریای جرجان (گرگان)، بحر مازندران بحر آبسکون، بحر قانیاوکاسپین نامیده می‌شد، بزرگ‌ترین دریاچه روی زمین است. این دریای بسته که در شمال کوه‌های آلپ - هیمالیا قرار گرفته، باقیمانده‌ای از دریای پاراتتیس است.

ریخت‌شناسی

بخش شمالی خزر، شیب بسیار ملایم دارد. دو بخش میانی و جنوبی، با یک برجستگی زیرآبی به نام برجستگی سرت در حدفاصل دماغه باکو و خلیج قره باغ (ترکمنستان) با امتداد شمال غربی - جنوب شرقی از یکدیگر جدا می‌شوند. این برجستگی، ادامه کوه‌های قفقاز است و ژرفای آب روی آن از ۲۰۰ متر است که این برجستگی، مانع جریان آب، در سطح دریا نیست. (آقانباتی، ۱۳۸۳)

حجم آب

بیش از دوسوم حجم آب دریای خزر در بخش جنوبی است. نزدیک به یک‌سوم از آب در بخش مرکزی و فقط حدود ۰/۱ درصد به بخش شمالی تعلق دارد (آقانباتی، ۱۳۸۳).

منابع تأمین کننده آب دریای خزر:

آب موجود در دریای خزر از منابع مختلفی تأمین می گردد. مهم ترین این منابع عبارت اند از: آب های سطحی و رودخانه ها، بارش، آب های زیرزمینی و چشمه ها

حدود ۱۳۰ رودخانه آب خود را به دریای خزر می ریزند که مهم ترین آن ها عبارت اند از:

- قلمرو ایران: اترک، گرگان رود، سفید رود و رودخانه متوسط و کوچک دیگر.

- قلمرو جمهوری آذربایجان: رودخانه کورا یا کوروش، رودخانه سمور

- قلمرو روسیه: رودخانه ولگا

- قلمرو جمهوری قزاقستان: رودخانه اورال، رودخانه امبا

رسوبات بستر

به دلیل ناهمگنی ریخت بستر، گسترش رسوب های وارده، ناهماهنگی است. سالانه رودهای وارده، به ویژه ولگا حدود ۹۰ میلیون تن رسوب را وارد دریا می کنند که در آن ها، سیلت از همه بیشتر است و همراه با دیگر انواع (ماسه، رس کربناتی دانه ریز) ستبرای قابل توجهی را تشکیل می دهند.

دمای آب

دما در تابستان تقریباً در همه جا برابر است. ولی در زمستان، بخش شمالی دریای خزر (دست کم چهار ماه) دمای زیر صفر دارد و یخبندان است در صورتی که در جنوب آن، هیچ گاه یخبندان نمی شود و متوسط دما ۵/۹ درجه سانتی گراد است.

تغییرات سطح آب

شواهد تاریخی نشان داده اند که سطح آب دریای خزر، همیشه در نوسان بوده است. اعداد گزارش شده، متفاوت است. در مجموع به نظر می رسد که بین بالاترین و پایین ترین سطح آب، ۹ متر اختلاف وجود داشته است. همچنین وسعت زیاد سطح آب دریا بر تغییرات آب و هوایی و حتی پستانداران پیرامون اثر گذارد.

تنوع زیستی

از لحاظ تنوع زیستی ۸۵۴ گونه جانوری و بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی در دریای خزر زندگی می کنند که به سه گروه عمده موجودات آب شیرین، لب شور و دریائی تعلق دارند. تعدادی از گونه ها جانوری و گیاهی از دریا های سیاه و آزوف به دریای خزر راه یافته اند در دریای خزر ۸۷۱ گونه از بی مهرگان و ۳۰۵ گونه موجودات کفزی درشت و ۵۶۶ گونه کفزی ریز گزارش شده است. وزن زنده (بیوماس) این موجودات در مناطق مختلف خزر متفاوت است. ماهیان دریای خزر از تنوع نسبی برخوردارند و تعداد آن در منابع علمی مختلف، متفاوت گزارش شده است. بیشترین فراوانی به ترتیب به گاوماهیان (۲۹ گونه)

و کپورماهیان (۱۹ گونه) تعلق دارد. در مجموع ۲۵ گونه ماهی با اهمیت اقتصادی و تجاری به بهره برداری می رسد (Ivanov, 2000) که دارای ویژگی های زیر هستند:

- جانورانی که دارای دو منشأ بومی یا مهاجر می باشند.
- موجوداتی که تنوع گونه ها محدود، ولی تعداد افراد هرگونه فراوان است.
- موجودات خاص محیط های دریایی، نظیر Radioloria، بازوپایان، اسفنج های آهکی، خارپوستان
- حدود ۶۰ درصد جانوران این دریا را ماهی ها، سخت پوستان و تعداد معدودی از نرم تنان تشکیل می دهند که در مقایسه با دریا های آزاد خود صفت مشخصی برای دریای خزر محسوب می شود.

۱-۱۳- ماهی کپور دریای خزر

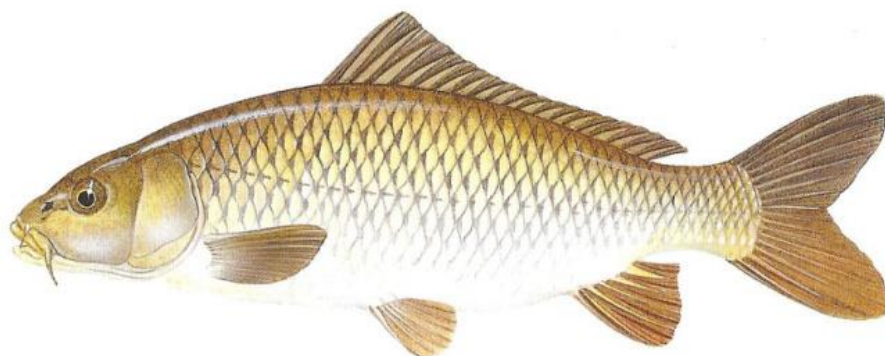
ماهی کپور دریای خزر (*Cyprinus carpio*)

رده بندی سیستماتیک کپور ماهی عبارت است از:

رده	Actinopterygii
راسته	Cypriniformes
خانواده	Cyprinidae
جنس	<i>Cyprinus</i>
گونه	<i>carpio</i>

مشخصات ظاهری

شکل بدن: دارای ۲ جفت سیبک، و دندان های حلقی با فرمول ۱و۱و۳-۳و۱و۱ یا ۱و۲و۳-۳و۲و۱می باشد. کپور معمولی فلس هایی درشت و باله پشتی ممتدی دارد. تعداد فلس های خط جانبی در این ماهی ۳۶ تا ۳۹ عدد می باشد. دهان آن خرطومی بوده و قابل بیرون زدن است. کپور معمولی در حوضه دریای خزر، رودخانه تجن و تمام حوضه آبریز ایران پراکنش دارد. حداکثر طول آن ۱۲۰ و میانگین ۳۸ سانتی متر گزارش شده است. بدن تا حدی دراز است و طول ۲/۵ تا ۳ برابر بیشتر از عرض بدن می باشد. سر ماهی بزرگ و پوزه کند است. باله مخرجی کوتاهی دارد. در باله پشتی ۳ تا ۴ شعاع سخت و ۱۸ تا ۲۰ شعاع نرم وجود دارد. در باله مخرجی نیز ۳ شعاع سخت و ۵ تا ۶ شعاع نرم وجود دارد (ویکی پدیا، ۱۳۹۶) (شکل ۱-۴).



شکل ۱-۴- ماهی کپور دریای خزر *Cyprinus carpio*

غذا

این ماهی همه چیز خوار است و از موجودات ریز بستر، کرم‌ها، سخت‌پوستان، نوزاد حشرات و حتی فضولات حیوانی و گیاهی، لاشه حیوانات، تخم ماهیان و حتی تخم‌ها و نوزادان خود تا حدودی تغذیه می‌کند.

کپور دریایی از گونه‌های بومی دریای خزر است که به‌طور طبیعی در حوضه دریای سیاه، آرال، دریای خزر و حوضه‌های کم‌عمق رودخانه ولگا زندگی می‌کند. همچنین این ماهی به کشورهای هلند، آلمان، دانمارک، سودان شمالی، انگلیس و ترکمنستان به‌صورت موفقیت‌آمیزی معرفی شده است (Berg, 1948). از نظر تاریخی کپور وحشی یکی از مهم‌ترین گونه‌ها برای صید و ماهی‌گیری در دریای خزر بوده که برای ساکنان این منطقه از اهمیت حیاتی برخوردار بوده است (Vazirzadeh, 2015). فعالیت‌های بدون برنامه‌ریزی مانند سدسازی در رودخانه‌ها، استفاده بی‌رویه از بستر رودخانه‌ها و تخریب مکان‌های تخم‌ریزی باعث کاهش جمعیت طبیعی کپور وحشی در سراسر جهان شده است که در حال حاضر بسیاری از مناطق از جمله حوضه آب‌های دریای مدیترانه و دریای خزر به‌عنوان گونه‌ای در معرض خطر قرار دارد (Vazirzadeh, 2015). در سال‌های اخیر افزایش صید مولدین ماهی کپور وحشی باعث مشکلاتی در تکثیر این ماهی گردیده که این امر موجب کاهش رهاسازی بچه ماهی کپور توسط کشورهای از جمله ایران، آذربایجان و روسیه (Barus و همکاران، ۲۰۰۱ Vazirzadeh و همکاران، ۲۰۱۱) شده است. این گونه عمدتاً در آب‌های گرم و نسبتاً آرام و راکد که دارای بسترهای شنی و یا لجنی پوشیده از گیاهان آبی می‌باشد، زندگی می‌کند (Ruchin et al., 2002). مناسب‌ترین درجه حرارت آب برای رشد و تغذیه آن ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. در طول دوره لاروی از پلانکتون‌های گیاهی و جانوری شامل جلبک‌ها، روتیفرها و سخت‌پوستان تغذیه، و هنگامی که به

طول ۱۸ میلی‌متر می‌رسد به تغذیه از کف زیان می‌پردازد (Balon, 1995). اندازه ماهی کپور نسبتاً بزرگ و به‌ندرت نمونه‌هایی به طول ۱۰۰ تا ۱۲۰ سانتی‌متر و وزن ۱۳ کیلوگرم مشاهده می‌شود اما غالباً به طول ۴۰ تا ۵۰ سانتی‌متر و به وزن ۳ تا ۶ کیلوگرم می‌باشد. بسته به شرایط اکولوژیک، در سن ۲ تا ۴ سالگی بالغ می‌شود. علی‌رغم جایگاه اقتصادی این ماهی در نزد مردم، صید آن همواره با نوساناتی مواجه بوده به‌طوری‌که در گذشته در دریای خزر و حوضه آبریز آن بیش از ۴ هزار تن بوده که تنها بیش از ۳ هزار تن آن در تالاب انزلی صید می‌شده است. در قسمت غربی تالاب انزلی منطقه ای به نام کپور چال وجود دارد، این منطقه ای بوده که در فصل زمستان ماهی‌های کپور به صورت گله ای در گودال بزرگی که در آن منطقه بوده جمع می‌شده اند. الان روستایی به نام کپور چال در این منطقه وجود دارد.

در سال‌های اخیر به دلیل کاهش چشمگیر ذخایر ماهیان خاویاری شرایط برای رشد و نمو و تولید مثل کپور دریای خزر فراهم شده به گونه ای که میزان صید در قسمت جنوب شرقی دریای خزر (استان‌های گلستان و مازندران) در حال افزایش است. (گفتگوی اختصاصی با دکتر حسین عمادی، ۱۳۹۶)

۱-۱۴- بیان مسئله اساسی تحقیق به‌طور کلی

سموم کشاورزی که توسط بشر ساخته می‌شوند و به‌عنوان انواع آفت‌کش و علف‌کش مورد استفاده قرار می‌گیرند دارای خواص ویژه‌ای هستند که باعث بقاء در محیط و در زنجیره غذایی شده و سبب ایجاد تأثیرات منفی روی آبزیان می‌شوند. از آنجاکه سواحل جنوبی دریای خزر به‌عنوان قطب مهم کشاورزی کشور محسوب می‌شوند، استفاده از سموم کشاورزی، علف‌کش‌ها و قارچ‌کش‌ها بسیار بالا می‌باشد. از جمله این سموم می‌توان به علف‌کش اکسادیازون اشاره کرد که با فرمول بسته ی $O_3C_{15}H_{18}CL_2N_2$ و نام تجاری رونستار استفاده می‌شود. مکانیسم اثر این سم به‌این ترتیب است که باعث تبدیل پروتوپورفیرینون (پیش ساز اصلی کلروفیل) به پروتوپورفیرین می‌شود. غالباً پس از کاربرد، این سموم از چند طریق نظیر شستشوی خاک مزارع در اثر بارندگی، نشت پساب‌های کشاورزی و وزش باد وارد رودخانه‌ها می‌شود و در نهایت موجب آلوده شدن آب دریا می‌شوند. ماهی کپور دریای خزر جزء ماهیان اقتصادی کشور بوده و به‌طور کلی یکی از مهم‌ترین گونه‌های کپور ماهیان (*Cyprinidae*) است که نمونه‌هایی از آن با وزن ۳۰ کیلوگرم هم صید شده است (Berg, 1948). این ماهی همه‌چیزخوار است و در آب‌های گرم و بسترهای شنی زندگی می‌کند و در حوضه‌های آبریز ایران مانند رودخانه تجن پراکنش دارد. در نهایت هرگونه آلودگی که به آب وارد شود، باعث ایجاد تغییرات در خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژی آن می‌شود که در سلامت آبزیان و محیط تأثیرگذار است. با توجه به چرخه زیستی ماهیان نظیر ماهی کپور وحشی در بخش‌های جنوبی دریا خزر، این علف‌کش‌ها در بافت‌های آن‌ها تجمع می‌یابند و به‌این ترتیب خساراتی که این سموم به جوامع

انسانی از طریق مصرف آبزیان آلوده می‌زنند کمتر از خساراتی نیست که به محیط و اکوسیستم‌های آبی به‌طور مستقیم وارد می‌کنند

۱۵-۱- اهمیت و ضرورت انجام تحقیق

به دلیل پایداری و انباشتگی علف‌کش‌ها در ماهی‌ها و خورده شدن آن‌ها توسط پرندگان و انسان (امکان صید بچه ماهیان در رودخانه‌ها توسط پرندگان وجود دارد)، این مواد شیمیایی پایدار و خطرناک وارد بدن شده و در بافت چربی ذخیره می‌شوند و می‌توانند در نهایت اثرات مضر و خطرناکی مانند تأثیر در رشد و نمو آن‌ها و همچنین تأثیر در رفتار ماهیان داشته باشند. علاوه بر آن در صورت جذب چربی‌های ذخیره شده در بدن و لاغر شدن ماهی‌ها در فصول مهاجرت و تولیدمثل، این مواد به مقدار فراوان وارد خون آن‌ها شده و سبب آلودگی، مسمومیت و حتی مرگ آن‌ها می‌گردند. از آنجا که ماهی کپور دریای خزر یکی از گونه‌های باارزش و اقتصادی است، بررسی میزان تجمع این سم در بافت‌های آن مهم و مورد توجه است.

۱۶-۱- جنبه جدید بودن و نوآوری در تحقیق

بررسی‌ها حاکی از آنند که تاکنون اثرات این سم روی هیچ‌یک از پارامترهای بیوشیمیایی (آلبومین، کلسترول، گلوکز و پروتئین تام) و خونی (شمارش افتراقی گلبول‌های قرمز و سفید، هموگلوبین، هماتوکریت و MCHC) و بافت‌شناسی اندام‌های عضله، کبد، کلیه و آب‌شش در ماهی کپور دریای خزر انجام نگرفته است.

۱۷-۱- اهداف تحقیق

- تعیین غلظت کشنده علف‌کش اکسادیازون در بچه ماهی کپور دریای خزر
- تعیین اثرات این علف‌کش بر رشد و مرگ و میر بچه ماهی‌های کپور
- تعیین میزان اثرات سم اکسادیازون بر تغییرات و تخریب DNA
- تعیین اثرات این علف‌کش بر فاکتورهای بیوشیمیایی (آلبومین، کلسترول، گلوکز و پروتئین تام)
- تعیین اثرات این سم بر فاکتورهای خونی (شمارش افتراقی گلبول‌های قرمز و سفید، هموگلوبین، هماتوکریت و MCHC)
- تعیین هیستوپاتولوژی بافت‌های عضله، کبد، کلیه و آب‌شش بعد از قرار گرفتن در معرض علف‌کش اکسادیازون.

۱۸-۱- سؤالات تحقیق

- آیا علف‌کش اکسادیازون اثر سوء بر بچه ماهی کپور پیش از مهاجرت به دریای خزر را دارد؟
- آیا این علف‌کش تأثیراتی بر ژنوم DNA موجود ماهی کپور دریای خزر دارد یا نه؟
- علف‌کش اکسادیازون چه اثراتی بر ساختار بافت‌های مهم عضله، کبد، کلیه و آب‌شش‌ها دارد؟

- آیا این علف‌کش روی پارامترهای بیوشیمیایی (آلبومین، کلسترول، گلوکز و پروتئین تام) تأثیر دارد؟
- میزان اثرات اکسادیازون بر پارامترهای خون‌شناسی (شمارش افتراقی گلبول‌های قرمز و سفید، هموگلوبین، هماتوکریت و MCHC) چقدر می‌باشد؟

۱-۱۹- فرضیه‌های تحقیق

بررسی‌های انجام‌یافته روی مواد سمی در گونه‌های مختلف ماهی نشان داده اند که در صورت کشنده نبودن حد موجود در آب، این سموم معمولاً در برخی از بافت‌های بدن تجمع یافته و سبب ایجاد تغییراتی گاه چشمگیر بر پارامترهای بیوشیمیایی، هماتولوژی و نیز تأثیر بر ژنوم DNA سلولی آن‌ها می‌شود.

فصل دوم: مروری بر ادبیات و

پیشینه تحقیق

محمد نژاد و همکاران در سال ۱۳۸۹ تحقیقی تحت عنوان "تعیین غلظت کشنده رانداپ روی بچه ماهیان سفید، کلمه و کپور دریایی" انجام دادند. بر اساس نتایج به دست آمده سمیت حاد علف کش رانداپ برای بچه ماهی های سفید، کلمه و کپور دریای خزر به ترتیب ۵۱۸۹، ۷۷۲۸، ۷۷۱۶ میلی گرم در لیتر محاسبه گردید. شیرین و همکاران در سال ۱۳۹۳، درجه سمیت مالاتیون و اثرات آن روی برخی شاخص های خونی بچه ماهیان کپور دریای خزر (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758) را مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس این مطالعه غلظت کشنده، حداقل غلظت مؤثر، حداکثر غلظت مجاز مالاتیون به ترتیب ۱/۳، ۰/۶۴۶ و ۰/۱۳ میلی گرم در لیتر به دست آمد.

در سال ۲۰۱۴ بنایی و زهیری تأثیر پارامترهای بیوشیمیایی فن پروپاترین را روی ماهی *Alburnus mossulensis* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه میزان LC50 را طی ۹۶ ساعت، برابر با ۱۲۱ میکروگرم در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد نشان داد.

جعفری نژاد و همکاران، در سال ۱۳۹۳ غلظت های ۴ و ۸ میکروگرم در لیتر سم فن پروپاترین روی ماهی کپور معمولی را بررسی و پس از گذشت ۹۶ ساعت هیچ تلفاتی مشاهده نکردند ولی در غلظت ۱۲ میکروگرم در لیتر، ۲۵ درصد ماهی ها تلف شدند و در غلظت ۱۶ و ۲۰ میکروگرم در لیتر ۵۰ درصد آنها از بین رفتند.

صفوی و همکاران در سال ۲۰۱۵ تأثیر غلظت های مختلف سم سایپرترین بر بافت آبشش سیاه ماهی (*Capoeta damascina*) را مورد بررسی قرار دادند. بر اساس این بررسی، غلظت های مختلف (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ میکروگرم در لیتر) تحت کشنده این سم، باعث آسیب هایی نظیر هایپرپلازی سلول های رأسی تیغه های آبششی، پوسته پوسته شدن اپیتلیال تیغه های آبششی، هایپرپلازی سلول های موکوسی در رشته های آبششی، فیوزن، کوتاه شدگی تیغه های آبششی، تورم رگی با شدت متفاوت در تیمارهای مختلف باعث گردیدند.

Buschini و همکاران در سال ۲۰۰۴ از سنجش های کامت و ریز هسته برای ارزیابی سلامت DNA گلبول قرمز ماهی کپور معمولی که به مدت ۲۰ روز در آزمایشگاه در معرض آب های دریاچه ای تیمار شده با ضد عفونی کننده های (هیپوکلریت سدیم، دی اکسید کلر) قرار گرفته بودند استفاده کردند. طبق نتایج گزارش شده پس از سه ساعت از شروع آزمایش، افزایش در شکستگی های DNA قابل تشخیص بود که نشان داد آسیب DNA به طور مستقیم در گلبول های قرمز در گردش القاشده بود.

Çavaş و همکاران ۲۰۰۷ در مطالعه ای اثرات ژنوتوکسیک علف کش glyphosate را روی ماهی طلایی (*Carassius auratus*) به صورت آزمایشگاهی ارزیابی نمودند. ماهیان در معرض سه غلظت (۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در لیتر) از این علف کش قرار گرفتند. در کل از ۷۵ ماهی (پنج ماهی برای هر غلظت در هر گروه)

برای آزمایش استفاده شد. آنالیزهای ریز هسته و آسیب DNA (سنجش کامت) روی گلبول‌های قرمز نمونه‌برداری شده در فواصل زمانی ۴۸، ۹۶ و ۱۴۴ ساعت پس از شروع آزمایش انجام گرفت. نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار وابسته به غلظت تعداد ریز هسته و سطح شکستگی‌های رشته‌ای DNA بود و بر تطابق بالای بایومارکرهای ژنوتوکسیتی مورد استفاده تأیید شد.

Sepici-Dinçel و همکاران در سال ۲۰۰۹ سمیت تحت حاد سم سیفلوترین روی فاکتورهای بیوشیمی، هماتولوژی، تغییرات هیستوپاتولوژی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انگشت قد را مورد بررسی قرار دادند. بر اساس این بررسی، غلظت ۱۰ میکروگرم در لیتر سیفلوترین برای ۴۸ ساعت و یک هفته با استفاده از سیستم آزمون نیمه راکد مورد آزمایش قرار گرفت. یافته‌های آنها نشان داد که بیشترین میزان کاهش کل آنتی اکسیدانی در ۴۸ ساعت بود و سطح کلرید در یک هفته کاهش یافته و سطح سدیم و فسفر در گروه در ۴۸ ساعت افزایش یافته بود. کورتیزول پلاسما در هر دو گروه ۴۸ ساعته و یک هفته ای افزایش یافته است. بافت منحصراً به فرد مغز بود که پس از یک هفته قرار گرفتن در معرض سطح بالای از مالون دی آلدئید دارا بود. چنین نشانگرهای زیستی ممکن است در ارزیابی اثر منفی آفت کش‌ها به عنوان عوامل استرس زا از محیط زیست استفاده شود. بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه برای اولین بار اثر سیفلوترین‌ها علاوه بر مسدود کردن کانال سدیم عصبی پتانسیل اکسیداتیو استرس زا پراکسیداسیون لیپیدی نیز گزارش شد.

Velisek و همکاران (۲۰۱۰) اثر تحت حاد علف‌کش تربوترین (*terbutryn*) روی ماهی کپور معمولی را مورد بررسی قرار دادند در این بررسی برای سمیت مزمن، ماهی‌های کپور معمولی یک کیلوگرمی را در غلظت‌های ۰/۰۲ (غلظت گزارش شده در رودخانه‌ها و چشمه‌ها)، ۴، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر به مدت ۲۸ روز تحت مواجهه قرار دادند، سپس با گروه کنترل مقایسه نمودند و تأثیر آن را بر پارامترهای بیومتریک، هماتولوژی، بیوشیمی خون و بافت‌شناسی بررسی کردند. بر اساس نتایج به دست آمده، قرار گرفتن در معرض تربوترین در ۰/۰۲ میکروگرم در لیتر، اثرات قابل توجهی نشان نداد، در حالی که قرار گرفتن در معرض ۴، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در لیتر تعداد اریتروسیت‌ها و میزان آمونیاک، آسپاراتات آمینوترانسفراز، لاکتات دهیدروژناز، کراتین کیناز و لاکتات را به میزان قابل توجهی افزایش داد اما به طور معنی‌داری متوسط هموگلوبین عضلانی و کراتین را پایین آورد. همچنین از لحاظ پاتولوژی تغییرات شکل سلول و اجزاء چربی در سلول‌های کبدی دیده شد، در بخش انتهایی کلیه، تخریب لوبول در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت. Zhu و همکاران تاثیرات علف‌کش atrazine^۱ را بر آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز) و آسیب DNA ماهی گورخری (*Danio rerio*) مورد بررسی قرار دادند. ماهیان در

^۱ (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1, 3, 5-triazine)

معرض ۴ غلظت ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر برای مدت ۷، ۱۴ و ۲۱ روز قرار گرفتند. نتایج سنجش کامت در غلظت‌های مختلف در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری یافت. بعلاوه افزایش در آسیب DNA با میزان ROS ناشی از تنش اکسیداتیو مطابقت داشت.

Nwani و همکاران در سال ۲۰۱۱، اثرات ژنوتوکسیک و موتاژنیک علف کش atrazine را در ماهی *Channa punctatus* توسط سنجش‌های ریز هسته و کامت مورد بررسی قرار دادند. سه غلظت مورد استفاده برای آزمون ۸/۴۸، ۵/۳۰ و ۴/۲۴ میلی گرم در لیتر بودند که به ترتیب یک پنجم، یک هشتم و یک دهم دوز LC50 بودند. نمونه برداری از خون و آبشش نمونه‌های ماهی در روزهای ۰، ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸ و ۳۵ مواجهه با سم صورت گرفت. طبق نتایج بیشترین میزان آسیب DNA در تمامی غلظت‌ها در روز پنجم بود که در ادامه با کاهش تدریجی غیر خطی همراه بود که احتمالاً به علت فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی و سیستم‌های ترمیم DNA در بافت‌ها و یا از بین رفتن سلول‌های با آسیب زیاد بود.

Chowdhury همکاران در سال ۲۰۱۳ دوزهای مختلف آفت‌کش مالاتیون روی ماهی *Clarias batrachus* (با نام محلی ماهی زئول) را که در آب شیرین دارای پروتئین مغذی نگهداری می‌شد، مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس این مطالعه، به مدت ۲۴ ساعت در غلظت‌های ۵ درصد (۸،۷۷ میلی گرم در لیتر ماده فعال) و ۱۰ درصد (۱۷،۷۴ میلی گرم در لیتر ماده فعال) غلظت مالاتیون قرار داده شدند. سپس به مدت سه هفته در مخازن سیمانی حاوی ۵۸۰ لیتر آب با جریان ثابت (۱ تا ۱/۵ لیتر در دقیقه) در آب شیرین دارای هوادهی و تحت نور طبیعی نگهداری شدند. هر هفته دو سی‌سی خون از هر نمونه برای تعیین پارامترهای هماتولوژی با استفاده از EDTA به عنوان یک ضد انعقاد استفاده شد. یافته‌های این مطالعه نشان دادند که مالاتیون در غلظت‌های مختلف تأثیرات متنوعی بر پارامترهای خون‌شناسی این ماهی دارد. غلظت ۱۰ درصد مالاتیون با کاهش شدید میزان RBC، ترومبوسیت، نوتروفیل و Hb باعث مرگ ماهی با نشانه کم‌خونی میکروسیتیک هیپوکرومیک می‌شد. از سوی دیگر، با قرار گرفتن در معرض غلظت ۵ درصد، لکوپنی به دلیل کاهش تعداد لکوسیت‌ها دیده شد. همچنین میزان غلظت هموگلوبین Hb، MCH، MCHC، MCV و میزان WBC به صورت معنی‌داری در غلظت ۵ درصد مالاتیون کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) داشت.

Harabawy و همکاران (۲۰۱۴)، سمیت کشنده آفت‌کش کربوفوران را روی فاکتورهای هماتولوژی، پاسخ بیوشیمیایی و سیتوزنتیک گربه‌ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* مورد مطالعه قرار دادند. در این بررسی، اثرات سمی دو غلظت تحت حاد کشنده (۰/۱۶ و ۰/۴۹ میلی گرم در لیتر)، آفت‌کش کربوفوران را به مدت ۳۵ روز روی پارامترهای بیوشیمیایی خون، پتانسیل ژنوتوکسیک و ریزه‌ستک گلبول قرمز بررسی کردند. بر اساس نتایج به دست آمده، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) و میزان غلظت هموگلوبین، هماتوکریت (HCT) و میانگین غلظت هموگلوبین (MCHC)، کاهش یافت، اما حجم میانگین هموگلوبین گلبول (MCH)

افزایش یافته بود ($P < 0.05$). همچنین تعداد گلبول‌های سفید، مانند نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها، بازوفیل‌ها و منوسیت‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش و لنفوسیت‌ها کاهش یافت ($P < 0.05$). در مورد آنزیم‌های، باعث افزایش آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و کاهش آلکالین فسفاتاز (ALP) ملاحظه گردید. همچنین افزایش غلظت گلوکز، کلسیم، اوره و کراتینین پلاسما دیده شد ولی میزان پروتئین کل، غلظت آلبومین و گلوبولین به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P < 0.05$). کاربو فوران باعث ایجاد تغییرات ژنوتیسی و مورفولوژیک در اریتروسیت‌ها از قبیل تشکیل ریز هستک (MN)، اکنوسیت‌ها، آکتوسیت‌ها، سلول‌های قطره اشکی، میکروسیت‌ها گلبول‌های قرمز خون با سیتوپلاسم و هسته واکوئله رنگ‌پریده شده بود. با افزایش غلظت سم کربو فوران میزان ضایعات نسبت به گروه شاهد بیشتر بود.

Saravanan و همکاران (۲۰۱۷)، تأثیر غلظت‌های مختلف بوتاکلر و علفکش اکسادیازون روی پاسخ کپور معمولی مورد مطالعه قرار دادند بر اساس این مطالعه غلظت‌های مختلف بوتاکلر و اکسادیازون به شدت کپورهای معمولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد بطوریکه تیمارهای ۰/۵، ۵ و ۵۰ میکروگرم بر لیتر از این علفکش‌ها در مدت ۹۶ ساعت باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید، سدیم، کلر، گلوکز، کلسترول و تری گلیسیرید سرم نسبت به گروه کنترل می‌شود. همچنین حداقل حجم سلولی (MCV)، حداقل هموگلوبین سلولی (MCH)، پتاسیم، آلکالین فسفاتاز (ALP) به‌طور قابل ملاحظه‌ای در تمام غلظت‌های اکسادیازون افزایش یافت. هر دو علفکش بوتاکلر و اکسادیازون سبب کاهش میزان هموگلوبین، هماتوکریت، تعداد گلبول‌های قرمز، سطح پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در تمام غلظت‌های مورد آزمایش شد.

Nataraj و همکاران ۲۰۱۷ تأثیر غلظت‌های مختلف آفت‌کش ارگانوفسفره پروفنوس را روی اکسیداتیو کبدی، سمیت ژنتیکی و تغییرات هیستوپاتولوژیک ماهی کپور هندی روهو (*Labeo rohita*) را مورد بررسی قرار دادند. غلظت کشنده (LC50) مقادیر پروفنوس برابر با ۰/۱ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۹۶ ساعت به دست آمد. همچنین برای سمیت تحت حاد از غلظت‌های ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر، سمیت حاد به مدت ۲۱ روز مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده، بعد از قرار گرفتن در معرض پروفنوس، فعالیت SOD و CAT تنها در روز هفتم افزایش یافت، اما در روزهای ۱۴ و ۲۱ در هر دو غلظت، فعالیت آنزیمی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین، میزان آنزیم‌های GST و LPO در تیمارهای تحت تأثیر سم در طول دوره مطالعه، به‌طور معنی‌داری ($p > 0.05$) افزایش یافت. همچنین بر اساس نتایج تخریب DNA به روش کامت، آسیب DNA در گلبول‌های قرمز به‌صورت وابسته به غلظت و زمان افزایش یافته بود. همچنین بر اساس نتایج هیستوپاتولوژیک در اندام‌های مختلف، تغییرات قابل توجهی مانند جدا شدن اپیتلیال، چسبیدگی لاملا و نکروز اپیتلیال در بافت آبشش دیده شد. هسته پیکنوتیک، واکوئله

شدن، دژنراسیون هسته‌ای، ادم سلولی در بافت کبد و نکروز توبول‌ها، چروکیدگی گلومرولی، دژنراسیون نفرون کلیه و هسته‌های پینوئیدی در بافت کلیه دیده شد.

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱- محل اجرا و آماده سازی مکان تحقیق

این تحقیق به مدت ۶۰ روز در مرداد ۱۳۹۵ در مرکز تکثیر ماهیان زینتی واقع در تهران - حصارک انجام گرفت. برای انجام این بررسی تعداد ۵۵۰ عدد بچه ماهی کپور دریایی خزر (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزنی ۱۵ گرم و میانگین طولی چنگالی ۱۱ سانتیمتر از مرکز تکثیر و پرورش ماهی آزاد شهید بهشتی رشت تهیه شد. ماهی ها در مخازن ۲۰۰ لیتری حاوی آب شیرین بدون کلر قرار گرفتند و به مدت یک هفته با محیط آدپته شدند. در طول هفته ماهی ها از لحاظ آلودگی انگلی و باکتریایی مورد بررسی قرار گرفتند و بر اساس ۲ درصد وزن بدن با غذای (FFC-Extruded)، سه وعده در روز، غذادهی شدند.

۳-۲- روش های اندازه گیری فاکتورهای فیزیکی، شیمیایی و فیزیکو شیمیایی آب

فاکتورهای فیزیکی، شیمیایی و فیزیکو شیمیایی آب با استفاده از روش های استاندارد اندازه گیری شدند. اکسیژن محلول با دستگاه اکسیژن متر، مقدار اسیدیته آب، به کمک pH متر پرتابل با الکتروود حساس مدل WTW۳۲۰- و دما به وسیله دماسنج دیجیتال (۲۳- ۲۷ درجه سانتی گراد) تعیین گردیدند.

۳-۳- تهیه غلظت های تحت کشنده اکسادیازون

در این مطالعه از علف کش اکسادیازون به صورت امولسیون ۱۲ درصد EC ساخت شرکت به کشت، تولیدکننده انواع سموم شیمیایی در ایران استفاده گردید. برای تهیه غلظت های موردنظر سم، ابتدا یک محلول استوک تهیه کرده و از این محلول برای تهیه غلظت های مورد آزمایش استفاده گردید (Koprucu et al., 2006).

۳-۴- آزمون سمیت حاد

برای انجام آزمون، ابتدا ماهی ها به مدت ۲۴ ساعت قطع غذادهی شدند، سپس به هریک از آکواریوم ها ۱۵۰ لیتر آب شیرین (بدون کلر) اضافه شد. برای تعیین LC50 ۹۶ ساعته، ۹ تیمار با دو تکرار و برای هر تکرار ۱۰ عدد ماهی در نظر گرفته شد و به ترتیب با غلظت های ۰/۵، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵ و ۵ میلی گرم در لیتر با گروه کنترل به مدت ۹۶ ساعت مورد مطالعه قرار گرفتند. در تمام مراحل آزمون، پارامترهای آب ثابت بودند. آزمون طی دوره ۹۶ ساعت بر اساس پروتوکل OECD 203 انجام و نتایج مرگ و میر طی ساعات صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ برای هر آکواریوم ثبت شد.



شکل ۳-۱- تلفات ۱۰۰ درصدی در دوزهای بالای علف کش اکسادپازون

۳-۵- آزمون سمیت مزمن

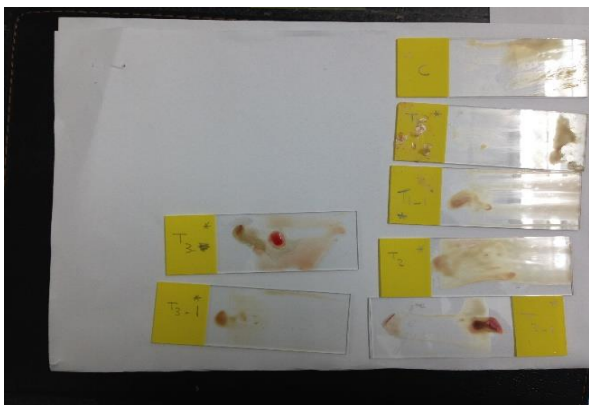
برای انجام این آزمون، ۱۵ عدد ماهی در هر آکواریوم به حجم مفید ۱۵۰ لیتر قرار داده شد. برای بررسی سمیت مزمن، نیاز به غلظتی از علف کش بود که باعث کشته شدن ماهی ها نشود. به همین جهت، غلظت های ۱ میلی گرم در لیتر، ۱/۵ میلی گرم در لیتر و ۲ میلی گرم در لیتر انتخاب شد. انجام این آزمون نیز بر اساس پروتوکل OECD 204 بود. آزمون طی دوره ۳۰ روزه انجام گرفت و برای تأیید صحت آن، آزمون با سه بار تکرار و نتایج به دست آمده از آن ها برای تحلیل و بررسی آماده شد (Harabawy, 2014).

۳-۶- ارزیابی بالینی و رفتاری

علائم بالینی و رفتارهای غیرمعمول ماهیان بلافاصله پس از آغاز آزمون های حاد و مزمن، به طور مرتب ثبت گردیدند.

۳-۷- نمونه برداری و خون گیری

نمونه برداری و خون گیری بعد از آدآپتاسیون طی روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰، به منظور بررسی برخی شاخص های خونی انجام شد. بدین منظور برای جلوگیری از استرس، ۲۴ ساعت قبل از خون گیری، تغذیه ماهیان قطع و از اسانس گل میخک به میزان ۰/۲ میلی لیتر به عنوان ماده بیهوش کننده استفاده گردید. برای جلوگیری از ورود موکوس و آب به نمونه خون، ماهی ها کاملاً خشک گردیده و به دلیل کوچک بودن آن و سختی پیدا کردن شریان خونی، بخشی از انتهای باله ی مخرجی قطع و خون گیری انجام می شد. از خون های گرفته شده، مقدار ۱ سی سی به طور مستقیم در لوله های سرولوژی فاقد ماده ضد انعقاد برای جداسازی سرم و ۱ سی سی به طور مستقیم در لوله های حاوی ماده ضد انعقاد هپارین به دقت ریخته شد. سپس با استفاده از سانتریفوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سرم جدا و با سمپلر در لوله های کوچک تخلیه و در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال و در شرایط فریزر (دمای ۲۰- درجه سانتی گراد) تا زمان انجام آزمایش نگهداری می شدند.



ب- لام‌های خونی برای رنگ آمیزی گیمسا



الف- خونگیری از ساقه دم به وسیله سرنگ ۲ سی سی

شکل ۳-۲- مراحل خونگیری

۳-۸- سنجش فاکتورهای سلولی خون

با توجه به این که شاخص‌های خونی مهم‌ترین فاکتورها در تکامل وضعیت فیزیولوژیک ماهی‌ها می‌باشند ، به‌اندازه گیری پارامترهای هماتولوژی پرداخته شد (Abdel-Tawwab et.al., 2008). آزمایش‌های هماتولوژی روی خون حاوی ماده ضد انعقاد هپارین انجام گرفت. در این بررسی روش اندازه‌گیری پارامترهای هماتولوژی شامل تعداد گلبول‌های قرمز ، تعداد گلبول‌های سفید ، هماتوکریت (PCV) و هموگلوبین (Hb) ، به روش توصیه شده توسط Feldman و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد.

سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی

برای سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی شامل آنزیم‌های کبدی، گلوکز، کلسترول، پروتئین کل و آلبومین نمونه‌ها به بیمارستان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انتقال و با استفاده از کیت پارس آزمون و با دستگاه اتو آنالایزر سنجش شدند.

۳-۹- روش تهیه نمونه‌های بافتی

برای تهیه نمونه‌های بافتی، برش طولی سرتا سری در سطح شکمی ماهی و نیز برای برداشتن آبشش یک برش عمودی روی سرپوش ایجاد شد. قسمت‌های موردنظر از محوطه بطنی و آبششی خارج شدند. نمونه‌ها به‌سرعت در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند و به آزمایشگاه پاتولوژی گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انتقال داده شدند. در آزمایشگاه قطعات کوچک‌تری از نمونه‌ها جدا شد و دوباره در محلول فرمالین به مدت یک روز دیگر ثابت شدند. سپس مراحل آگیری، شفاف‌سازی و آغشته کردن با پارافین انجام گرفت. بلوک‌های پارافینی تهیه و به‌وسیله میکروتوم، برش‌هایی به ضخامت پنج میکرون تهیه گردید. سپس این برش‌ها با رنگ آمیزی معمول هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. مقاطع بافتی تهیه‌شده از بافت آبشش، کبد، کلیه، عضله و طحال با میکروسکوپ نوری نیکون ژاپن، مدل Eclipse E600 موردبررسی قرار گرفتند. عکس‌برداری از مقاطع بافتی مذکور توسط دوربین دیجیتال u

eye2250 با نرم افزار میکروبین نسخه ۲ انجام شد و در نهایت بارگذاری تصاویر با نرم افزار axiovision نسخه ۴/۸ انجام گردید.

۳-۱۰- مراحل تهیه برش از بافت ها (شکل ۳-۳):

تهیه مراحل بافتی شامل مراحل آورده شده در زیر بود:

۱. نمونه برداری

۲. مرحله تثبیت

۳. آماده سازی بافت ها

۴. تهیه برش های بافتی :

این مرحله خود دارای نه مرحله به شرح زیر بود :

۱. آب گیری

۲. شفاف کردن یا الکل زدایی

۳. آغشته کردن با پارافین

۴. قالب گیری

۵. برش بافتی

۶. قرار دادن برش ها روی لام

۷. خشک نمودن

۸. رنگ آمیزی

۹. ثابت کردن لام ها



ب- قالب‌های پارافینی



الف- نمونه برداری در فالكون‌های ۵۰CC با فرمالین ۱۰ درصد



د- لام‌های تهیه شده به وسیله رنگ آمیزی H & E



ج- برش نمونه‌های بافتی با استفاده از دستگاه میکروتوم لایکا به قطر ۵ میکرون

شکل ۳-۳- مراحل تهیه مقاطع بافتی

۳-۱۱- بررسی هیستوپاتولوژی

لام‌های رنگ‌آمیزی شده در اختیار پاتولوژیست قرار گرفت. پارامترهای پاتولوژی به‌دقت مورد ارزیابی قرار گرفتند و از مقاطع در زیر میکروسکوپ نوری، عکس تهیه شد. بر این اساس، مقایسه دقیقی میان گروه‌های مورد آزمون سمیت مزمن و گروه کنترل از نظر آسیب بافتی انجام شد و میزان ایجاد ضایعات احتمالی پاتولوژی در هر سه مرحله آزمایش سمیت مزمن پس از ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفتند.

۳-۱۲- بررسی میزان تخریب DNA سنجش کامت (Comet assay)

اندازه‌گیری آسیب DNA به روش سنجش کامت قلیایی (Singh *et al.*, 1988) با اندکی اصلاحات صورت گرفت. در این پژوهش برای بررسی و اندازه‌گیری میزان تخریب DNA (اندازه‌گیری شکستگی‌های رشته‌های DNA) از روش سنجش ستاره دنباله‌دار (Comet assay) استفاده شد. بر اساس اهداف تعیین‌شده تحقیق در آخرین روز از مرحله تحت تأثیر قرارگیری سم از هر گروه تیمار و گروه شاهد نمونه‌ی خون تهیه شد و مورد آزمایش قرار گرفت.

۳-۱۳- آزمون کامت قلیایی برای بررسی میزان آسیب DNA (Alkaline Comet Assay)

سنجش کامت (Comet assay)

پس از خونگیری $10 \mu\text{l}$ از خون با $1/5 \text{ ml}$ فسفات بافر سالین (PBS) رقیق سازی شده و سپس $15 \mu\text{l}$ از این سوسپانسیون با $170 \mu\text{l}$ آگارز 0.5% درصد با نقطه ذوب پایین (low melt) مخلوط و بلافاصله روی لام سمبراده‌ای یا زیر که قبلاً با آگارز نقطه ذوب نرمال پیش پوشش داده شده بود منتقل شده و پس از سرد سازی، لام‌ها در محلول بافر لایزیز تازه تهیه شده برای مدت یک ساعت در دمای 4°C درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس برای باز شدن پیچش رشته‌های DNA، لام‌ها برای مدت 20 دقیقه درون بافر قلیایی ($\text{pH} > 13$) قرار داده شدند. در ادامه لام‌ها به تانک الکتروفورز حاوی بافر قلیایی منتقل و برای مدت 20 دقیقه با شرایط 25 V و 300 mA و دمای 4°C درجه سانتیگراد، الکتروفورز صورت گرفت. پس از آن با سه حمام 5 دقیقه‌ای، در محلول بافر خنثی سازی انجام شد و در نهایت لام‌ها توسط رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و به کمک میکروسکوپ اپی فلوئورسانس با فیلتر برانگیختگی مناسب مجهز به دوربین تصاویر دیجیتال از لام‌ها تهیه شد. برای هر ماهی دو عدد لام و در هر لام دو لامل در نظر گرفته شد که در هر کدام حدود 100 سلول در نقاط مختلف بصورت تصادفی انتخاب شد.

تهیه محلول‌های مورد استفاده در سنجش کامت

محلول لیز کننده (لایزیز بافر)

برای تهیه محلول استوک مقادیر $146/19$ گرم NaCl ، $37/24$ گرم EDTA و $1/25$ گرم Tris به صورت خشک وزن و داخل ارلن با 900 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شدند و توسط مگنت (هم‌زن مغناطیسی) خوب به هم زده شد. برای تهیه یک محلول شفاف و یک دست، هم زدن به مدت طولانی (1 الی 2 ساعت) همراه با گرمادهی ($50^\circ\text{C} - 60^\circ\text{C}$) انجام شد (سر ارلن با ورق آلومینیوم برای جلوگیری از تبخیر بسته شد). این محلول با اضافه کردن چند قطره NaOH 1 نرمال روی 10 تنظیم شد. حجم محلول با 100 میلی‌لیتر آب مقطر دیگر به 1000 میلی‌لیتر رسانده شد. برای تهیه محلول کاری، 90 میلی‌لیتر از محلول استوک با 1 میلی‌لیتر Triton X-100 ، 9 میلی‌لیتر DMSO^1 و یک گرم نمک سدیم لاریل سارکوزینات² مخلوط و یک ساعت قبل از استفاده در یخچال نگه داری می‌شد.

محلول (بافر) الکتروفورزی

¹ Dimethyl sulfoxide

² sodium lauryl sarcosinate

³ Ca^{+2} - and Mg^{+2} -free phosphate-buffered saline (PBS)

مقادیر ۴۰ گرم NaOH در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۴/۸۹ گرم EDTA در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شدند. سپس ۳۰ میلی‌لیتر از محلول NaOH به همراه ۵ میلی‌لیتر محلول EDTA مخلوط و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد. در نهایت pH با NaOH به بالای ۱۳ رسانده شد.

محلول (بافر) خشی کننده

مقدار ۴/۸۵ گرم Tris در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد pH محلول روی ۷/۵ تنظیم و با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیگر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

محلول (بافر) نمکی فسفات^۱

مقادیر ۸ گرم NaCl، ۲ گرم KCl، ۱/۴۴ گرم Na_2HPO_4 ، ۰/۲۴ گرم KH_2PO_4 به صورت خشک وزن و مخلوط شدند. به این مخلوط مقدار ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. برای ایجاد شدن یک محلول شفاف و یکدست محلول خوب به هم زده شد. pH محلول با اضافه کردن چند قطره HCl و ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی ۷/۵ تنظیم شد.

۳-۱۴- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به نتایج تحقیق با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۷، از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه و بر اساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ ($\text{mean} \pm \text{SD}$)، انجام گرفت.

فصل چهارم: تجزیه و تحلیل داده‌ها

۱-۴ نتایج فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب

براساس نتایج به دست آمده فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب محل انجام آزمایش برای کار تحقیقاتی روی ماهی کپور دریایی مناسب بود. نتایج فاکتورها در جدول ۱-۴ نشان داده شده است.

جدول ۱-۴- فاکتورهای کیفی آب

دما	۲۷-۲۳ درجه سانتی گراد
pH	۷/۸ - ۷/۲
اکسیژن	میانگین ۸ میلی گرم در لیتر
سختی آب	کمتر از ۳۰۰ میلی گرم کربنات کلسیم در لیتر

۲-۴ نتایج آزمون سمیت حاد

میزان سمیت حاد علف کش اکسادiazon با استفاده از روش Behrens و Karber، ۳/۹ میلی گرم در لیتر به دست آمد (جدول ۲-۴). به علت جذب سریع علف کش اکسادiazon توسط آبشش ماهی ها، بیشتر تلفات ماهیان در اولین ساعت پس از اضافه شدن به آب رخ داد.

جدول ۲-۴- بررسی میزان غلظت کشندگی ۵۰ درصد علف کش اکسادiazon با روش Behrens-Karber و نرم افزار Microsoft

Excel ۲۰۱۰

حجم آب (لیتر)	تعداد ماهی	وزن ماهی (گرم)	غلظت اکسادiazon (mg/L)	درصد مرگ و میر	A	B	AB	جمع AB	LC 50 (mg/L)	غلظت برای بیوس (g/L)	LC 50 (mg/g fish)
۱۸۰	۱۰	۱۵	۰	۰	۰	۰	۰	۹/۹۵	۳/۹	۰/۸۳	۴/۶۷
۱۸۰	۱۰	۱۵	۰/۵	۰	۰/۵	۰	۰	۰	۰/۸۳	۰/۸۳	
۱۸۰	۱۰	۱۵	۲/۵	۰	۲	۰	۰	۰	۰/۸۳	۰/۸۳	
۱۸۰	۱۰	۱۵	۳	۱۰٪	۰/۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۸۳	۰/۸۳	
۱۸۰	۱۰	۱۵	۳/۵	۲۰٪	۰/۵	۱/۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۸۳	۰/۸۳	
۱۸۰	۱۰	۱۵	۳/۷	۳۰٪	۰/۲	۲/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۸۳	۰/۸۳	
۱۸۰	۱۰	۱۵	۴	۵۰٪	۰/۳	۴	۱/۲	۱/۲	۰/۸۳	۰/۸۳	
۱۸۰	۱۰	۱۵	۴/۵	۷۰٪	۰/۵	۶	۳	۳	۰/۸۳	۰/۸۳	
۱۸۰	۱۰	۱۵	۵	۱۰۰٪	۰/۵	۸/۵	۴/۲۵	۴/۲۵	۰/۸۳	۰/۸۳	

۳-۴ نتایج آزمون سمیت مزمن

ارزیابی بالینی و رفتاری

بر اساس نتایج حاصله، در غلظت ۳/۹ میلی گرم در لیتر که در عمل حد کشنده ی ۵۰ درصد در ۹۶ ساعت بود (LC50 96h) رفتار ماهیان بصورت شای عصبی، افزایش تعداد تنفس، حرکات ناگهانی و فرو رفتن به

عمق دیده شد (شکل ۴-۱-الف). همچنین در سمیت مزمن با کاهش غلظت علف کش اکسادیازون از شدت علایم عصبی کاسته می شد. از لحاظ علائم ظاهری پرخونی آبشش ها و افزایش موکوس مشاهده گردید (شکل ۴-۱-ج). بر اساس علایم کالبد گشایی در سمیت مزمن تحلیل کلیه، خونریزی کبد و خونریزی در کیسه شنا دیده شد (شکل ۴-۱-د و ب).



ب- پرخونی در آبشش



الف- فرورفتن به عمق



د- تحلیل رفتن کلیه



ج- پرخونی در کبد



نمونه شاهد

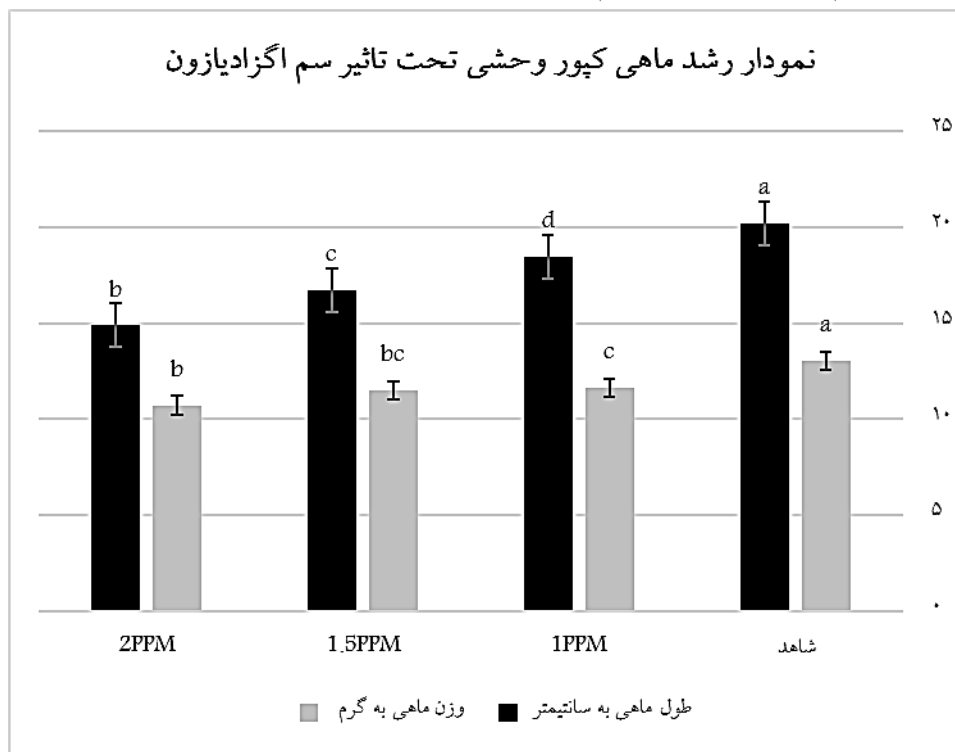


ه- دیستروفی عضلانی و آبکی شدن عضله

شکل ۴-۱- علایم کالبد گشایی در سمیت مزمن

۴-۴- بررسی اثرات علف کش اکسادiazon بر رشد و مرگ و میر بچه ماهی کپور دریای خزر

اثرات علف کش اکسادiazon بر رشد و افزایش طول و وزن بچه ماهی کپور دریای خزر در نمودار ۴-۱ آورده شده است. بر اساس این نمودار میانگین رشد گروه شاهد دارای بیشترین افزایش وزن و بیشترین طول ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه‌های تحت مواجهه با علف کش اکسادiazon بود. همچنین کمترین میزان رشد در گروه ۲ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادiazon دیده شد که اختلاف معنی داری ($p < 0.05$) با گروه شاهد، گروه‌های ۱/۵ میلی گرم در لیتر و ۱ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادiazon داشت.



نمودار ۴-۱- اثرات علف کش اکسادiazon بر طول و وزن بچه ماهی کپور دریای خزر

۴-۵- سنجش فاکتورهای سلولی خون

جدول شماره ۴-۳، فاکتورهای سلولی خون را در دوره ی اول آزمایش، جدول ۴-۴ همین فاکتورها را در دوره ی دوم آزمایش و جدول شماره ۴-۵، فاکتورهای یاد شده را در دوره سوم آزمایش نشان می دهند.

جدول ۴-۳ فاکتورهای سلولی خون در دوره اول آزمایش

فاکتورها				تیماها
شاهد				تیما ۱ ۱ میلی گرم
				تیما ۲ ۱/۵ میلی گرم
				تیما ۳ ۲ میلی گرم
گلوکز (GLU)	۸۹/۳۳ ± ۷/۰۲ ^a	۷۲/۶۷ ± ۱/۵۳ ^b	۸۷ ± ۹ ^a	۸۶ ± ۱ ^a
آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)	۱۰/۳۳ ± ۱/۵۳ ^a	۱۸ ± ۱ ^a	۱۶ ± ۱ ^a	۱۶/۳۳ ± ۰/۵۸ ^a
اسپاراتات ترانس آمیناز (AST)	۱۴۰ ± ۱۲/۱۲ ^b	۳۲۵/۳۳ ± ۱۰/۲۱ ^a	۳۲۶/۳۳ ± ۸/۵ ^a	۳۱۵/۶۷ ± ۱۷/۲۴ ^a
آلکالین فسفاتاز (ALP)	۷۴/۳۳ ± ۲/۵۲ ^c	۱۰۵/۶۷ ± ۵/۵۱ ^a	۹۰ ± ۷/۵۵ ^b	۷۳/۶۷ ± ۱/۵۳ ^c
پروتئین کل (T.P)	۲/۷۴ ± ۰/۰۲ ^a	۱/۹ ± ۰/۱ ^c	۲/۱۷ ± ۰/۰۶ ^b	۲/۰۷ ± ۰/۰۶ ^b
آلبومین (ALB)	۰/۹۶ ± ۰/۰۲ ^a	۰/۵۳ ± ۰/۰۶ ^c	۰/۸ ± ۰/۱ ^b	۰/۵۳ ± ۰/۰۶ ^c
کلسترول (CHO)	۵۶ ± ۲ ^d	۱۰۵/۳۳ ± ۱/۵۳ ^b	۱۱۲ ± ۱ ^a	۹۱/۳۳ ± ۱/۵۳ ^c

جدول ۴-۴ فاکتورهای سلولی خون در دوره دوم آزمایش

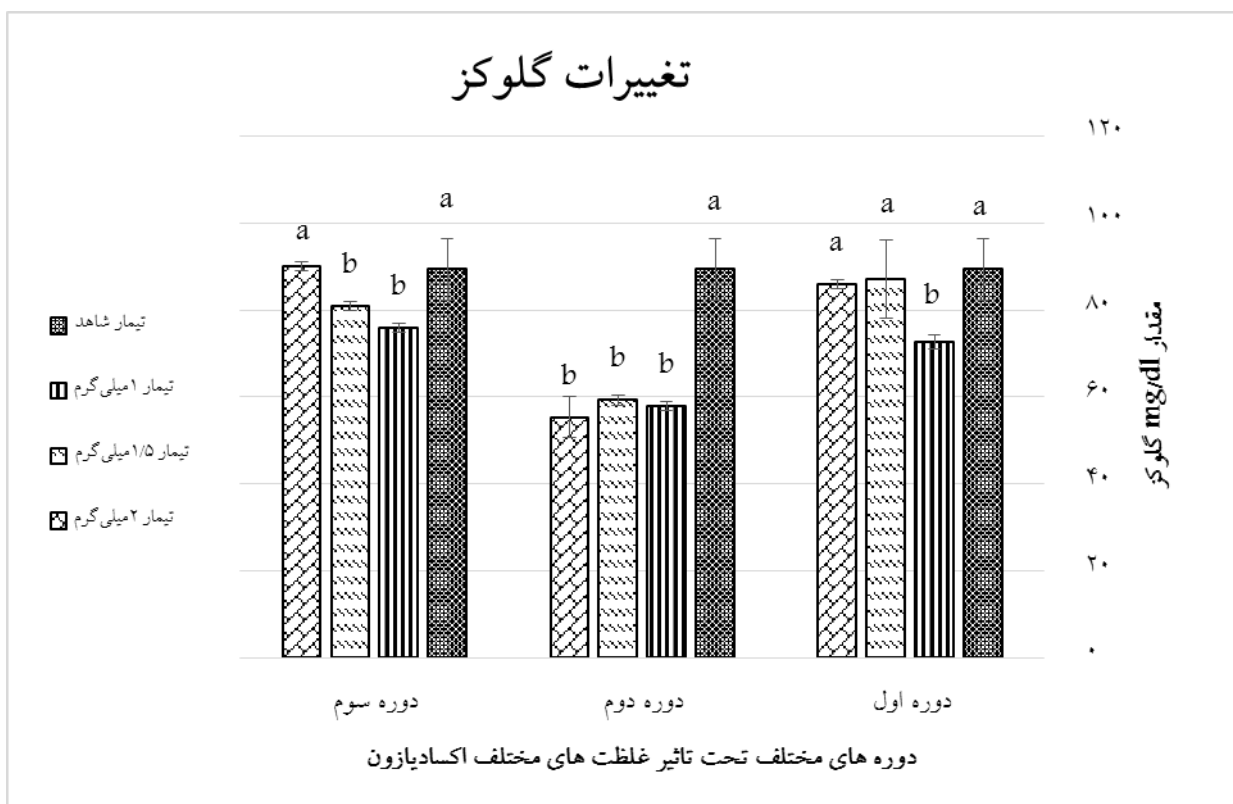
فاکتورها				تیماها
شاهد				تیما ۱ ۱ میلی گرم
				تیما ۲ ۱/۵ میلی گرم
				تیما ۳ ۲ میلی گرم
گلوکز (GLU)	۸۹/۳۳ ± ۷/۰۲ ^a	۵۸ ± ۱ ^b	۵۹/۳۳ ± ۱/۱۵ ^b	۵۵/۳۳ ± ۴/۷۳ ^b
آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)	۱۰/۳۳ ± ۱/۵۳ ^d	۳۷ ± ۱ ^b	۴۷ ± ۱/۷۳ ^a	۲۵ ± ۶/۰۸ ^c
اسپاراتات ترانس آمیناز (AST)	۱۴۰ ± ۱۲/۱۲ ^c	۳۲۷/۶۷ ± ۹/۰۲ ^a	۳۰۵/۳۳ ± ۱۳/۲۰ ^a	۲۷۴/۶۷ ± ۱۷/۴۷ ^b
آلکالین فسفاتاز (ALP)	۷۴/۳۳ ± ۲/۵۲ ^b	۹۳/۳۳ ± ۳/۵۱ ^a	۶۷/۳۳ ± ۲/۰۸ ^c	۷۷/۳۳ ± ۲/۰۸ ^b
پروتئین کل (T.P)	۲/۷۴ ± ۰/۰۲ ^a	۱/۴۵ ± ۰/۰۵ ^d	۱/۹۷ ± ۰/۰۲ ^b	۱/۸۳ ± ۰/۰۳ ^c
آلبومین (ALB)	۰/۹۶ ± ۰/۰۲ ^a	۰/۶۳ ± ۰/۰۲ ^d	۰/۷۸ ± ۰/۰۲ ^b	۰/۷۲ ± ۰/۰۱ ^c
کلسترول (CHO)	۵۶ ± ۲ ^b	۵۵ ± ۱ ^b	۸۴/۳۳ ± ۳/۰۶ ^a	۸۱ ± ۱ ^a

جدول ۴-۵- فاکتورهای سلولی خون در دوره سوم آزمایش

فاکتورها				تیمارها
شاهد	تیمار ۱ ۱ میلی گرم	تیمار ۲ ۱/۵ میلی گرم	تیمار ۳ ۲ میلی گرم	
گلوکز (GLU)	۸۹/۷±۳۳/۰۲ ^a	۱±۷۶ ^b	۱±۸۱ ^b	۱±۹۰ ^a
آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)	۱۰/۱±۳۳/۵۳ ^c	۲۱/۰±۶۷/۵۸ ^a	۱۷/۰±۶۷/۵۸ ^b	۱±۹ ^c
اسپاراتات ترانس آمیناز (AST)	۱۲±۱۴۰/۱۲ ^c	۳۴۹/۴±۳۳/۰۴ ^a	۵±۲۸۰ ^b	۱۵۲/۲±۲۳/۰۸ ^c
آلکالین فسفاتاز (ALP)	۷۴/۲±۳۳/۵۲ ^a	۶۲/۰±۳۳/۵۸ ^b	۷۴/۷±۳۳/۲۳ ^a	۷۳/۶±۶۷/۰۳ ^a
پروتئین کل (T.P)	۲/۰±۷۴/۰۲ ^a	۰/۰±۹۷/۰۱ ^d	۱/۰±۹۸/۰۱ ^b	۱/۰±۶۷/۰۲ ^c
آلبومین (ALB)	۰/۰±۹۶/۰۲ ^a	۰/۰±۸۵/۰۲ ^b	۰/۰±۷۳/۰۲ ^b	۰/۰±۶۳/۰۲ ^d
کلسترول (CHO)	۲±۵۶ ^c	۱±۷۸ ^a	۱±۶۴ ^b	۶۲/۱±۳۳/۵۳ ^b

۴-۵-۱- تغییرات میزان گلوکز

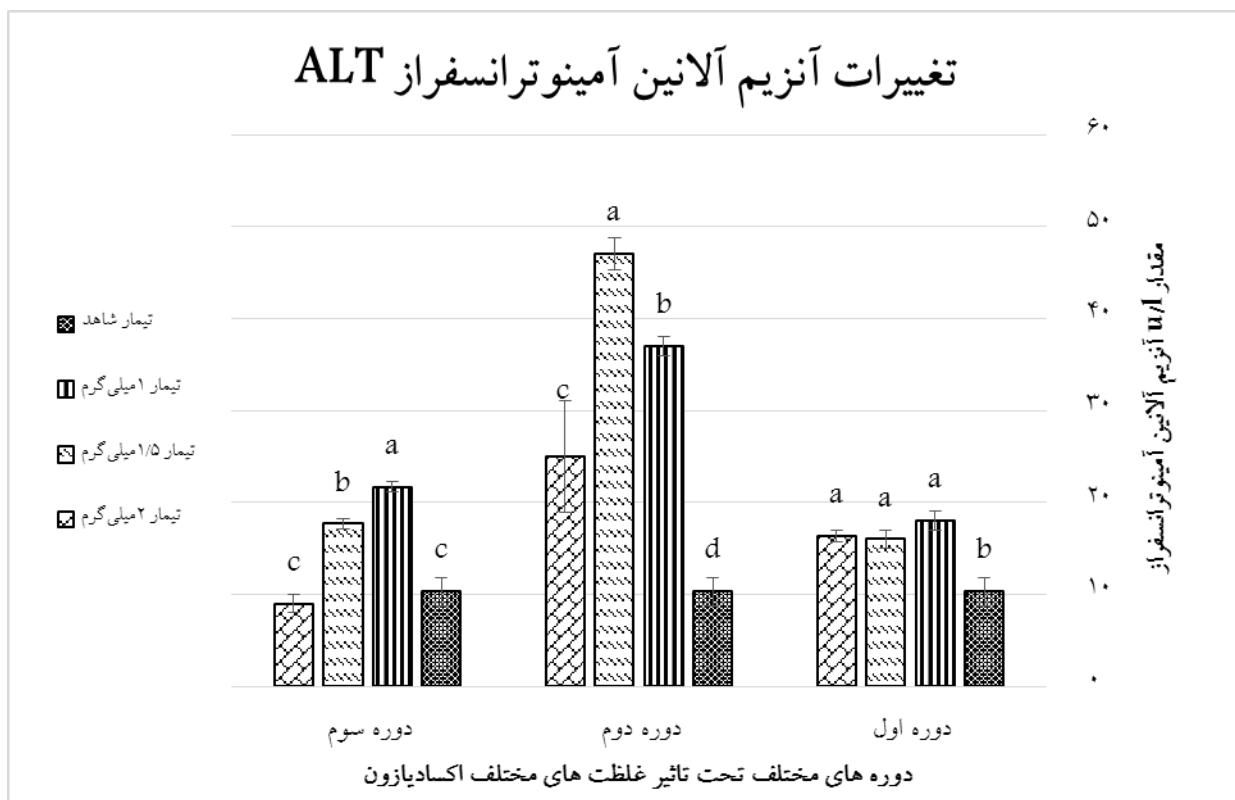
میزان گلوکز دوره‌های مختلف آزمایش در نمودار ۴-۲ نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده در دوره اول میزان گلوکز در تیمار شاهد که در آن علف کشی به کار نرفته بود؛ بیشتر از تیمارهای آزمایشی بود. در دوره دوم نیز همین نتیجه به دست آمد و تیمار شاهد اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0.05$). در انتهای دوره سوم تیمار ۳ که در آن ماهیان تحت تاثیر ۲ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادیازون قرار گرفته بودند و تیمار شاهد میزان گلوکز بالاتر بود و این دو تیمار اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان دادند ($P < 0.05$). کمترین میزان این پارامتر نیز در تیمار ۱ به دست آمد.



شکل ۴-۲- میزان گلوکز خون در دوره‌های مختلف قرار گرفتن ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف اکسادیازون

۴-۵-۲- تغییرات آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT)

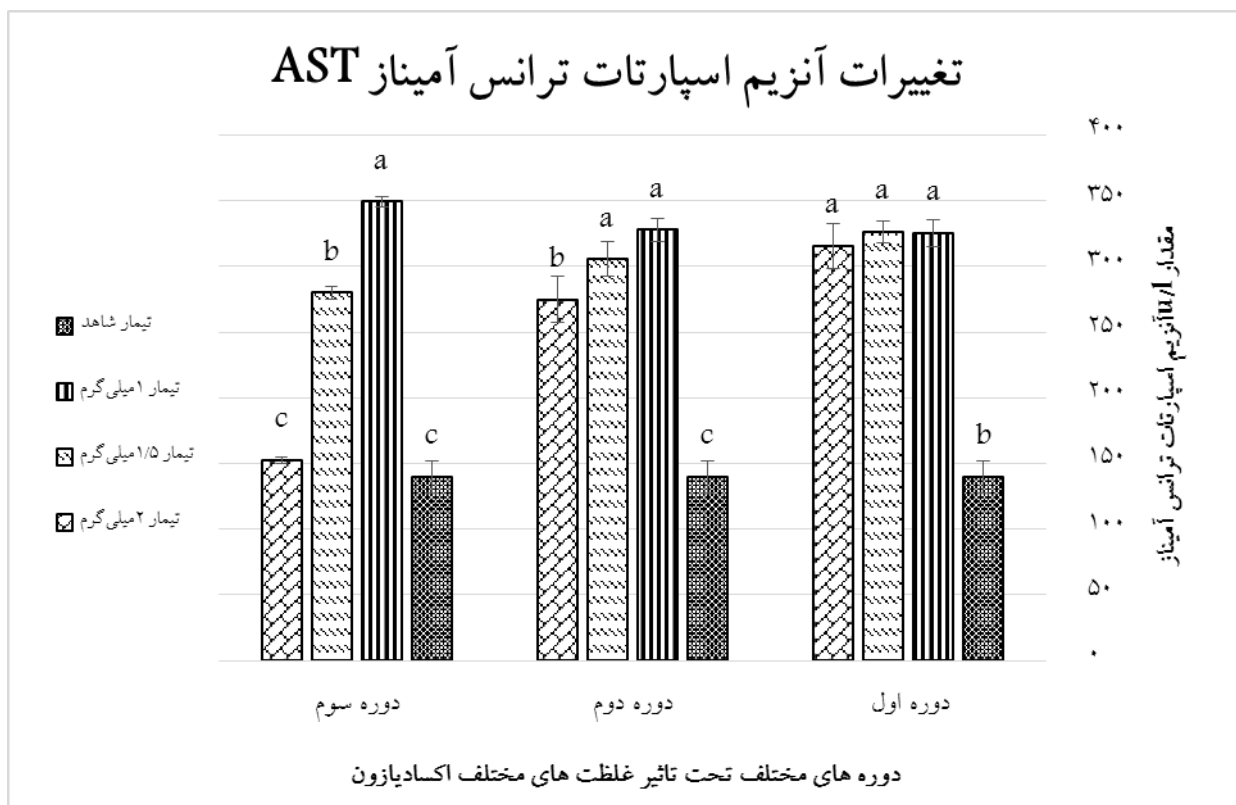
میزان آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) دوره‌های مختلف آزمایش در نمودار ۴-۳ نشان داده شده است. طبق نتایج بدست آمده در دوره اول، میزان این آنزیم در تیمار شاهد که در آن علف کشی به کار نرفته بود، کمتر از سایر تیمارهای آزمایشی بود و این تیمار اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0.05$). در دوره دوم نیز همین نتیجه به دست آمد و این تیمار با کمترین میزان آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0.05$). در انتهای دوره سوم تیمار ۳ که در آن ماهیان تحت تاثیر ۲ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادیازون قرار گرفته بودند و تیمار شاهد کمترین میزان آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) را دارا بودند و این دو تیمار اختلاف معنی داری با سایر تیمارها داشتند ($P < 0.05$). در انتهای دوره دوم بیشترین میزان این پارامتر در تیمار ۱/۵ میلی گرم در لیتر به دست آمد.



شکل ۴-۳- میزان آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) خون در دوره‌های مختلف قرار گرفتن ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف اکسادیازون

۴-۵-۳- تغییرات آنزیم اسپارتات ترانس آمیناز (AST)

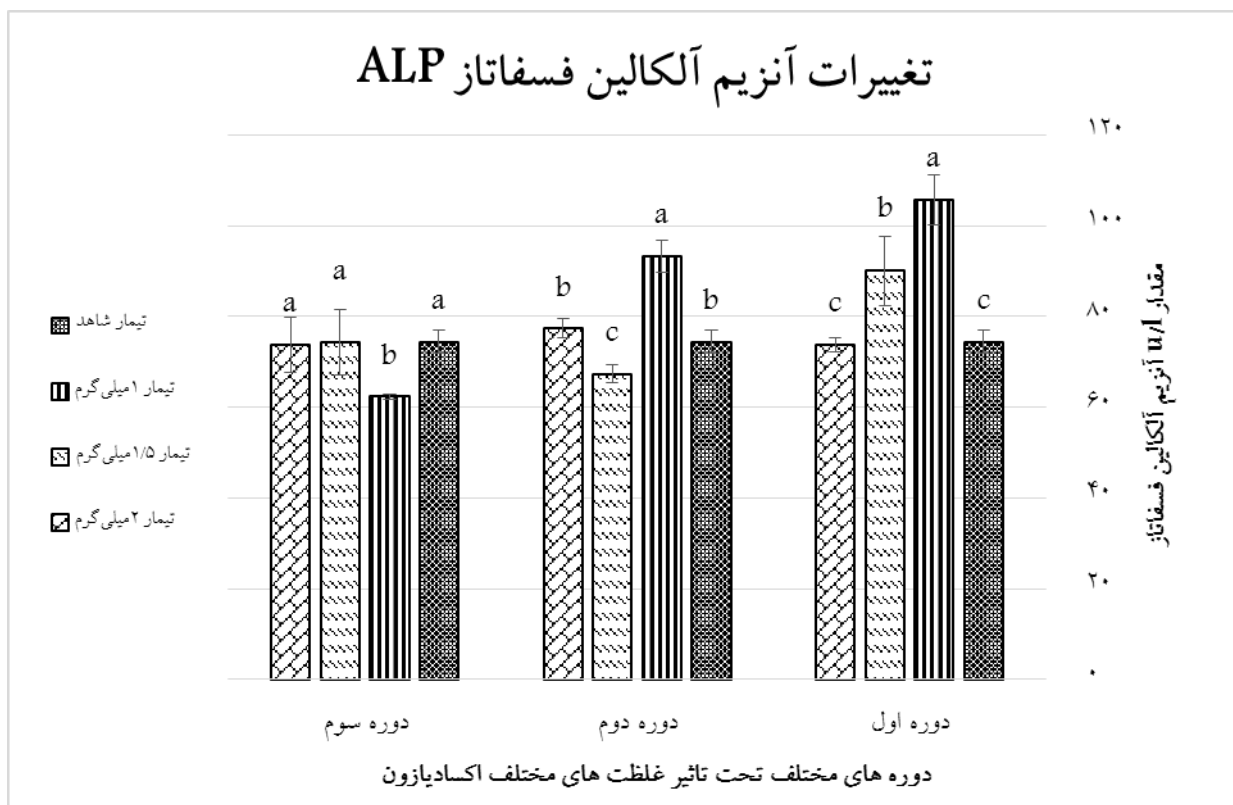
میزان آنزیم اسپارتات ترانس آمیناز (AST) دوره‌های مختلف آزمایش در نمودار ۴-۵ نشان داده شده است. طبق نتایج حاصله در دوره اول، میزان این آنزیم در تیمار شاهد که در آن علف کشی به کار نرفته بود، کمتر از سایر تیمارهای آزمایشی بود و این تیمار اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0.05$). در دوره دوم نیز همین نتیجه به دست آمد و این تیمار از لحاظ کمترین میزان آنزیم اسپارتات ترانس آمیناز (AST) اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0.05$). در انتهای دوره سوم تیمار ۳ که در آن ماهیان تحت تاثیر ۲ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادیازون قرار گرفته بودند و تیمار شاهد کمترین میزان آنزیم اسپارتات ترانس آمیناز (AST) را دارا بودند و این دو تیمار اختلاف معنی داری با سایر تیمارها داشتند ($P < 0.05$). بیشترین میزان این پارامتر در انتهای دوره مربوط به تیمار ۱ بود.



شکل ۴-۴- میزان آنزیم اسپارتات ترانس آمیناز (AST) خون در دوره‌های مختلف قرار گرفتن ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف اکسادیازون

۴-۵-۴- تغییرات آلکالین فسفاتاز (ALP)

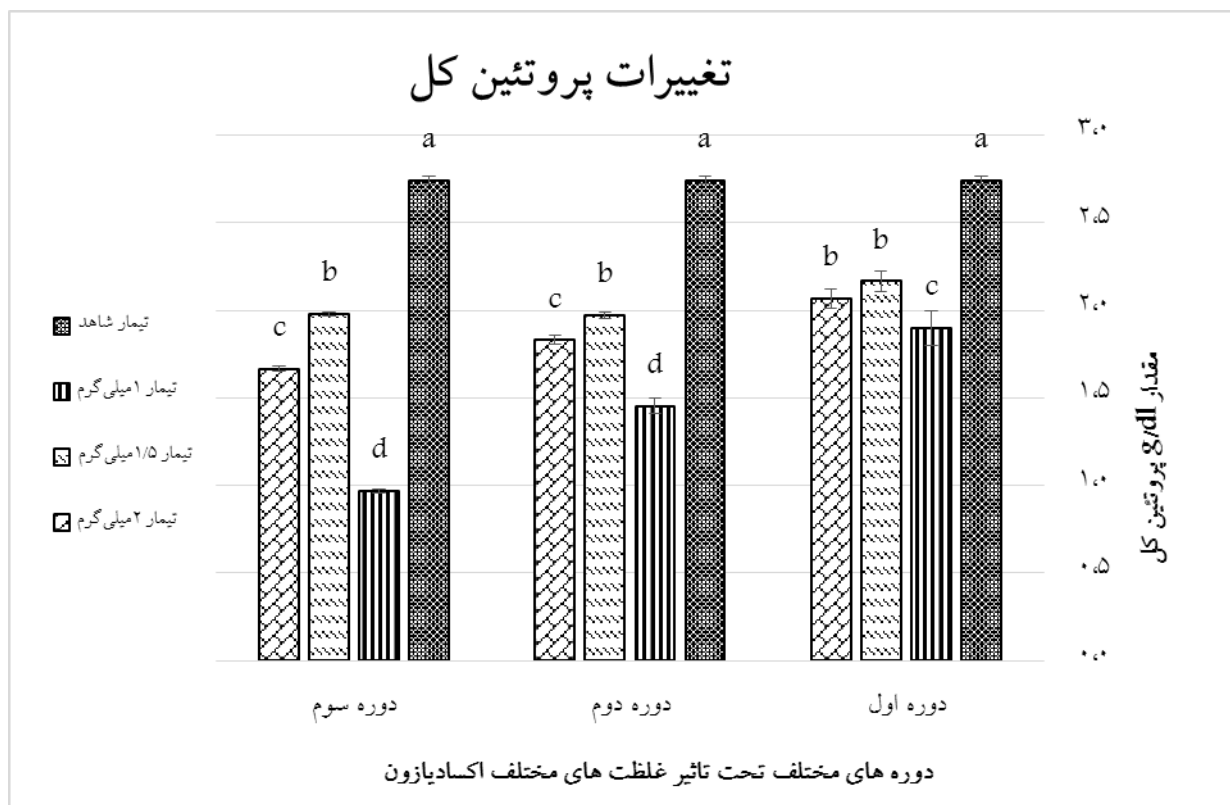
میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) دوره‌های مختلف آزمایش در نمودار ۴-۵ نشان داده شده است. طبق نتایج بدست آمده در دوره اول، میزان این آنزیم در تیمار ۱ که در آن ماهیان تحت تاثیر ۱ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادiazon قرار گرفته بودند، بیشتر از سایر تیمارهای آزمایشی بود و این تیمار اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0.05$). در دوره دوم نیز همین نتیجه به دست آمد و این تیمار از لحاظ بیشترین میزان آلکالین فسفاتاز (ALP) اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0.05$). در انتهای دوره سوم نتیجه متفاوتی به دست آمد و میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در تیمار ۱ به شدت افت کرد و این تیمار کمترین میزان این آنزیم را در انتهای دوره دارا بود سایر تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند ($P < 0.05$).



شکل ۴-۵- میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) خون در دوره‌های مختلف قرار گرفتن ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف اکسادiazon

۴-۵-۵- تغییرات پروتئین کل

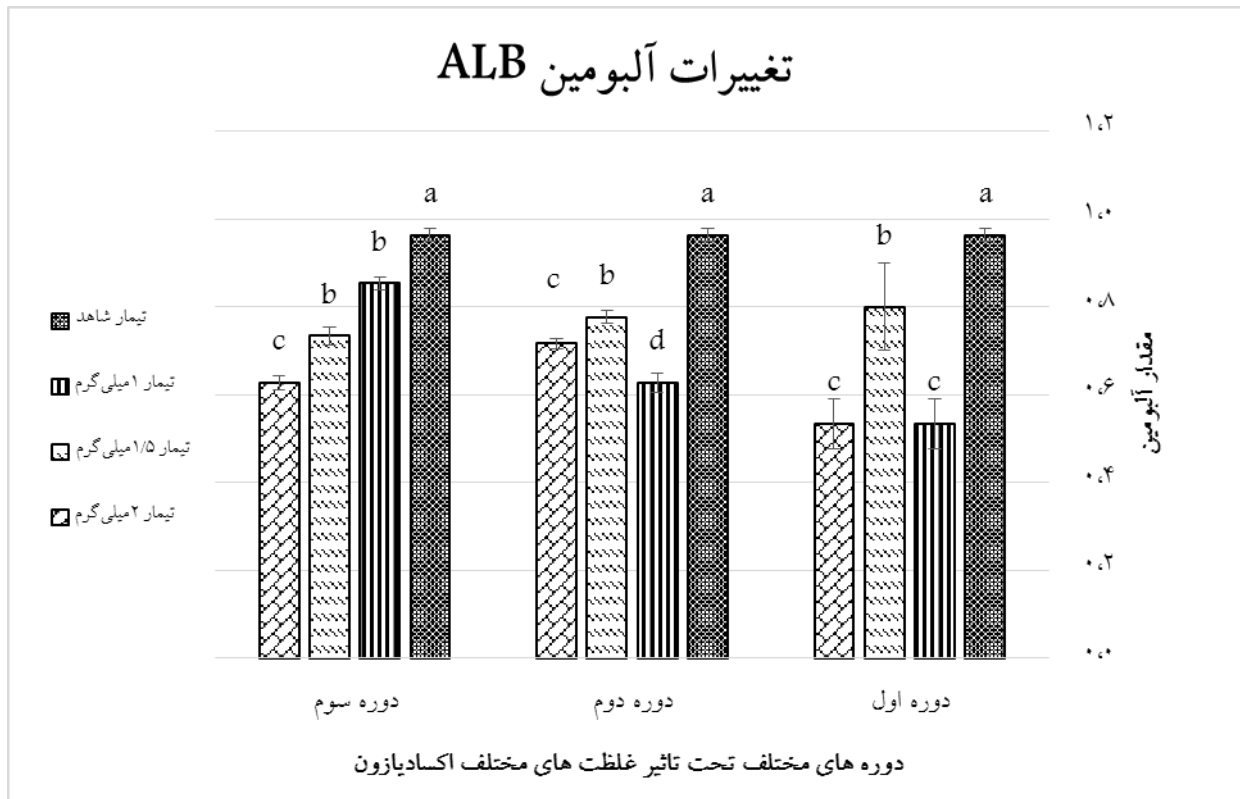
میزان پروتئین کل در دوره‌های مختلف آزمایش در نمودار ۴-۶ نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده در دوره اول، میزان پروتئین کل در تیمار شاهد که در آن علف کشی به کار نرفته بود، بیشتر از تیمارهای آزمایشی بود. در دوره دوم و سوم نیز همین نتیجه به دست آمد و تیمار شاهد از لحاظ بالاترین مقدار پروتئین کل اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0/05$). بعد از تیمار شاهد تیمار ۲ که در آن ماهیان تحت تاثیر ۱/۵ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادیازون قرار گرفته بودند و تیمار ۳ که در آن ماهیان تحت تاثیر ۱ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادیازون قرار گرفته بودند به ترتیب مقدار بالاتری از پروتئین کل را دارا بودند. تیمار ۱ نیز که در آن ماهیان تحت تاثیر ۱ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادیازون قرار گرفته بودند دارای کمترین میزان پروتئین کل بوده و تمامی تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی داری نشان دادند ($P < 0/05$).



شکل ۴-۶- میزان پروتئین کل خون در دوره‌های مختلف قرار گرفتن ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف اکسادیازون

۴-۵-۶- تغییرات آلبومین (ALB)

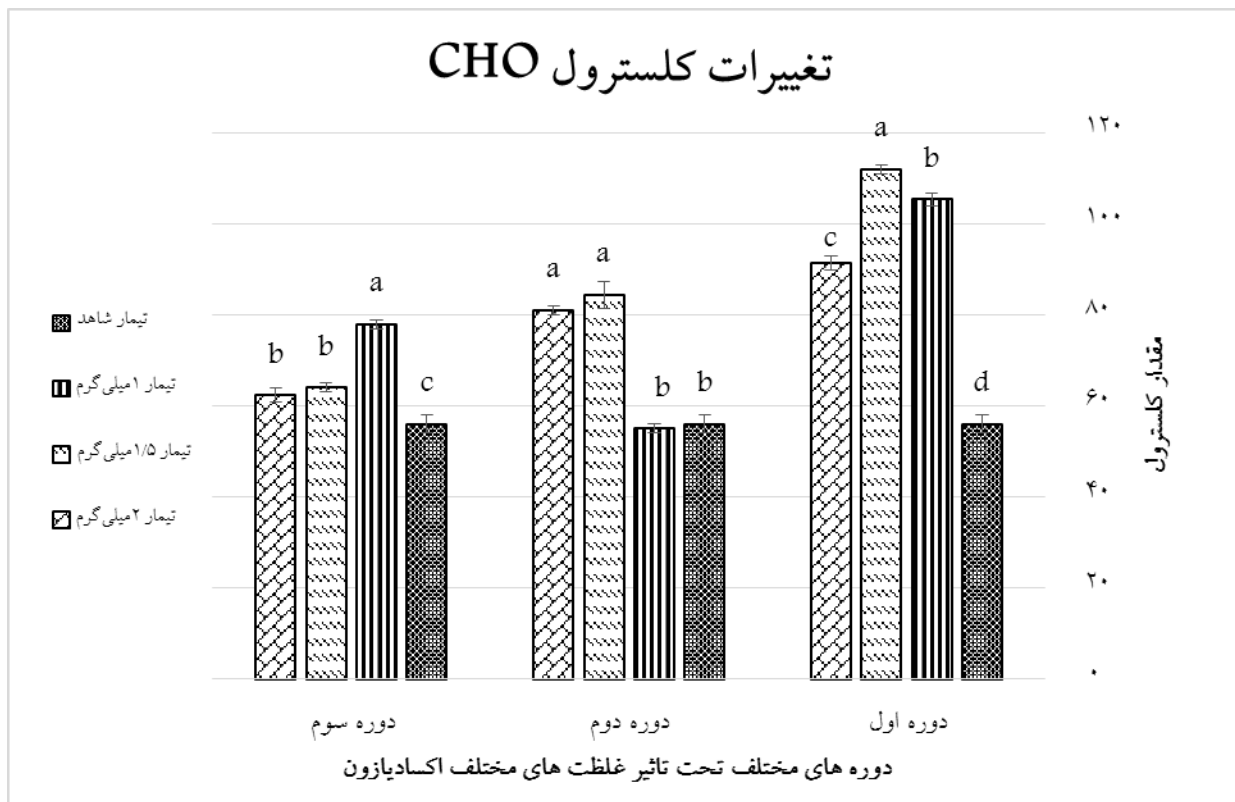
میزان آلبومین (ALB) در دوره‌های مختلف آزمایش در نمودار ۴-۷ نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده در طی ۳ دوره آزمایش، میزان آلبومین در تیمار شاهد که در آن علف کشی به کار نرفته بود، بیشتر از تیمارهای آزمایشی بود و تیمار شاهد از لحاظ بالاترین میزان آلبومین اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0.05$).



شکل ۴-۷- میزان آلبومین (ALB) در دوره‌های مختلف قرار گرفتن ماهی کپور معمولی در غلظت‌های مختلف اکسادیازون

۴-۵-۷- تغییرات کلسترول

میزان کلسترول دوره‌های مختلف آزمایش در نمودار ۴-۸ نشان داده شده است. طبق نتایج حاصله در دوره اول، میزان گلوکز در تیمار ۲ که در آن ماهیان تحت تاثیر ۱/۵ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادیازون قرار گرفته بودند، بیشتر از شاهد و تیمارهای آزمایشی بود. در دوره دوم این تیمار و تیمار ۳ دارای بالاترین میزان کلسترول بود و اختلاف معنی داری با تیمار ۱ و شاهد نشان دادند ($P < 0/05$). در دوره سوم تیمار ۱ که در آن ماهیان تحت تاثیر ۱ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادیازون قرار گرفته بودند دارای میزان کلسترول بالاتری بود و این تیمار اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0/05$). کمترین میزان این پارامتر نیز در تیمار شاهد به دست آمد.



شکل ۴-۸- میزان کلسترول دوره‌های مختلف آزمایش

۶-۴ - تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی خون

میزان تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی کپور دریایی در تیمارهای مختلف در جدول ۶-۴ نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده، میزان هموگلوبین، تعداد گلبول‌های سفید شمارش شده، درصد هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز در تیمار ۳ که در آن ماهیان تحت تاثیر ۲ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادیازون قرار گرفته بودند، کم تر از شاهد و تیمارهای آزمایشی بود و اختلاف معنی داری با تیمارهای مختلف و شاهد نشان دادند ($P < 0.05$). همچنین براساس شمارش افتراقی گلبول‌های سفید درصد نوتروفیل در در تمامی تیمارها افزایش یافته بود.

جدول ۶-۴ - تاثیر سم اکسادیازون بر روی فاکتورهای خونی ماهی کپور دریایی خزر پس از گذشت ۳۰ روز

تیمار				U/L فاکتورهای اندازه گیری
شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	
شاهد	۱ میلی گرم در لیتر	۱/۵ میلی گرم در لیتر	۲ میلی گرم در لیتر	
HB (g/dl)	۶/۹±۰/۳۶a	۶/۶۵±۰/۲۴a	۵/۷±۰/۲۶b	۴/۰۷±۰/۵۸c
WBC ($10^3 \times$ تعداد در میلی متر مکعب)	۲۷/۱۶±۰/۵۶b	۲۸/۲۶±۰/۴۹b	۳۱/۰۳±۰/۴a	۳۳±۱/۹۹a
PCV (%)	۳۳±۱a	۳۱/۱±۰/۶۸ab	۳۰/۲±۱b	۲۵/۸۳±۱/۴c
RBC ($10^6 \times$ تعداد در میلی متر مکعب)	۴/۲۶±۰/۲a	۴/۲±۰/۴a	۳/۷۴±۰/۲۱a	۲/۸۷±۰/۵b
MCV (fl)	۷۷/۳۹±۱/۶۱a	۷۴/۴۴±۱/۴a	۸۰/۷۶±۲/۲۸a	۹۱/۷۶±۱۶/۷۳a
MCH (Pg)	۱۶/۲۲±۱/۵۳a	۱۵/۶۹±۰/۹۸a	۱۵/۲۸±۱/۵۱a	۱۴/۶۳±۴/۴۳a
MCHC (%)	۲۰/۹۳±۱/۵۷a	۲۱/۱۱±۰/۴۷a	۱۸/۹۰±۱/۴۹a	۱۵/۷۳±۱/۹۲b

۷-۴- نتایج هیستوپاتولوژی

نتایج هیستوپاتولوژی حاصل از بررسی مقاطع بافتی ماهی‌های شاهد و قرار گرفته در تیمارهای مختلف به شرح زیر می‌باشد:

۷-۴-۱- مقاطع بافتی تهیه شده از بافت‌های تیمار شاهد

بافت کبد در تیمار شاهد

در بررسی میکروسکوپی، بافت پارانشیم کبد از هپاتوسیت‌های چندضلعی با هسته مرکزی (A) تشکیل شده بودند. مجاری صفراوی با اپیتلیوم پوششی مکعبی (B) به ندرت دیده شدند. همچنین ورید مرکزی (D)، فضاهای سینوزوئیدی (E) و بافت برون ریز لوزالمعده (C) مشاهده شد (شکل ۷-۴ _ الف).

بافت آبشش در تیمار شاهد

از نظر هیستولوژی، در بافت آبشش ماهیان گروه شاهد، لاملاهای اولیه مشاهده شدند که لاملاهای ثانویه به صورت موازی با هم و عمود بر سطح لاملای اولیه قرار گرفته بودند (شکل ۷-۴ _ ب).

بافت عضله مخطط اسکلتی در تیمار شاهد

میوفیبریل‌های عضلانی به صورت موازی با هم در برش طولی مشاهده شدند. هسته‌های دوکی شکل و بازوفیلیک در زیر غشای پلاسمایی (سارکولما) مشاهده شدند. تخطط‌های عرضی در برش طولی به خوبی دیده شدند (شکل ۷-۴ _ ج).

بافت کلیه در تیمار شاهد

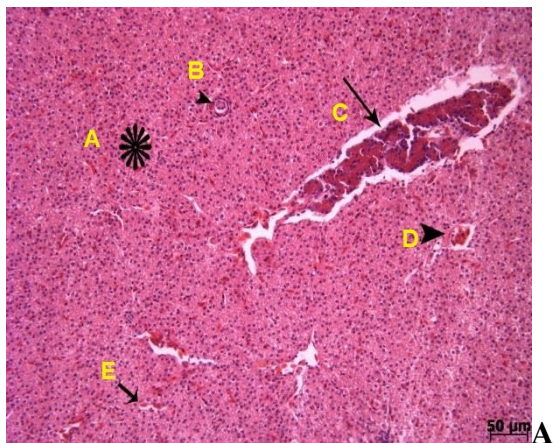
در بررسی هیستولوژی بافت کلیه، گلومرول‌ها، مجاری ادراری پروگسیمال و دیستال، بافت بینابینی و عروق خونی مشاهده شدند (شکل ۷-۴ _ د).

بافت طحال در تیمار شاهد

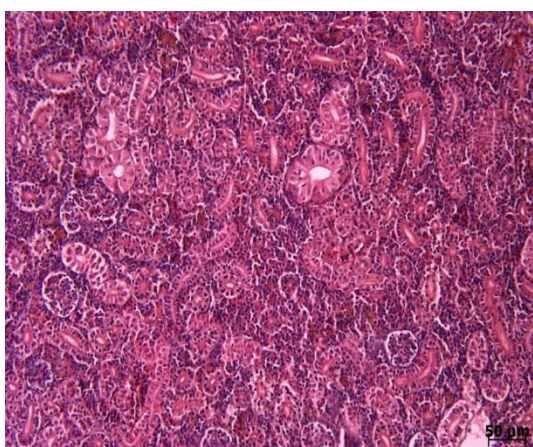
اغلب عروق خونی، پولپ قرمز و پولپ سفید مشاهده شدند. پولپ قرمز شامل طنابهای طحالی و مویرگهای سینوزوئیدی حاوی گلبولهای قرمز بود و در پولپ سفید، اغلب سلولهای لنفوئیدی، عروق شریانی و کمی کمی مراکز ملانوماکروفاژی دیده شدند (شکل ۷-۴ _ ه).



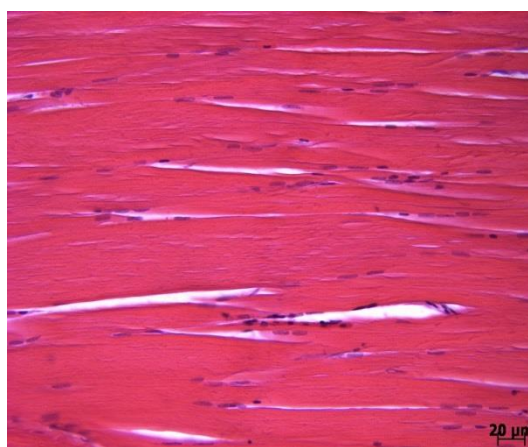
ب- بافت آبشش



الف- بافت کبد



د- بافت کلیه



ج- بافت عضله مخطط اسکلتی



ه- بافت طحال

شکل ۴-۲- نتایج هیستوپاتولوژی بافت‌های مختلف در بیمار شاهد

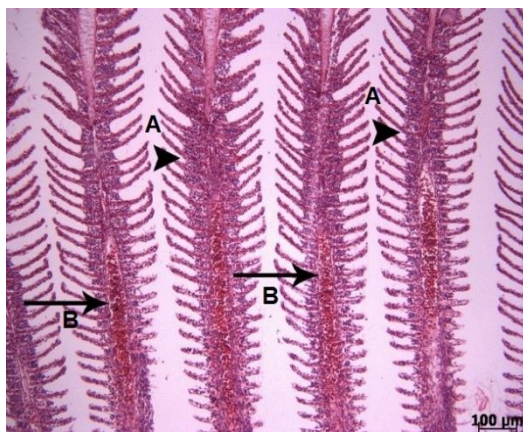
۴-۷-۲- مقاطع بافتی تهیه شده از بافت‌های تیمار ۱

بافت آبشش در تیمار ۱

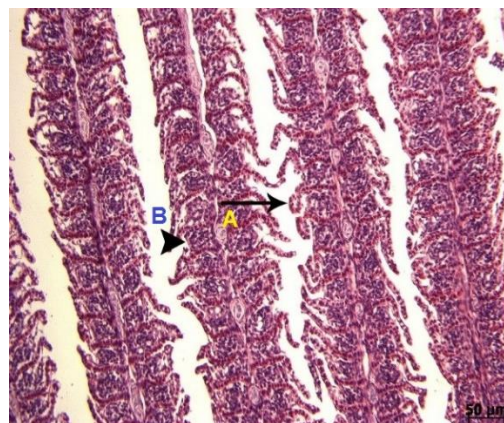
شکل ۴-۳-الف- ماهی‌ها این تیمار، آخر ۱۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون در این بافت چماقی شدن لاملاهای ثانویه (A)، هایپرپلازی سلولهای اپیتلیوم پوششی لاملائی ثانویه و نفوذ سلولهای التهابی (B) مشاهده شد (شکل ۴-۳-الف).

شکل ۴-۳-ب- ماهی‌های این تیمار، ۲۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون در این بافت، افزایش متوسط در هایپرپلازی سلولهای اپیتلیوم پوششی لاملائی ثانویه و نفوذ سلولهای التهابی (A) و پرخونی عروقی (B) مشاهده شد (شکل ۴-۳-ب).

شکل ۴-۳-ج- ماهی‌های این تیمار، ۳۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون در این بافت، هایپرپلازی سلولهای اپیتلیوم پوششی لاملائی ثانویه، نفوذ سلولهای التهابی و در نهایت از بین رفتن لاملاهای ثانویه (فلش) در اغلب مقاطع مشاهده شد (شکل ۴-۳-ج).



ب- آخر ۲۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم- نفوذ سلولهای التهابی و پرخونی عروقی



الف- آخر ۱۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم - هایپرپلازی سلولهای اپیتلیوم پوششی لاملائی ثانویه و نفوذ سلولهای التهابی



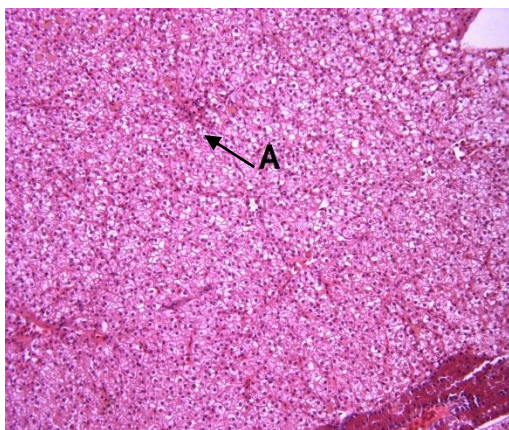
ج- آخر ۳۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم
شکل ۴-۳- نتایج هیستوپاتولوژی بافت آبشش در تیمار ۱

بافت کبد در تیمار ۱

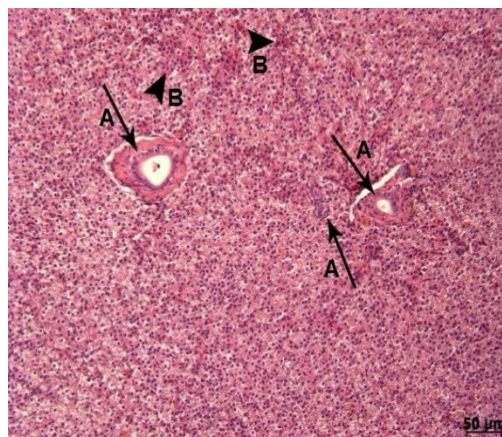
شکل ۴-۴-الف- ماهی‌ها این تیمار، ۱۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون در این بافت، پرخونی سینوزوئیدها (A) مشاهده شد. همچنین هایپرپلازی خفیف مجاری صفراوی (B) به همراه کمی همبند فیروز دیده شد (شکل ۴-۴-الف).

شکل ۴-۴-ب- ماهی‌ها این تیمار، ۲۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون فقط پرخونی سینوزوئیدها (A) مشاهده شد. (شکل ۴-۴-ب).

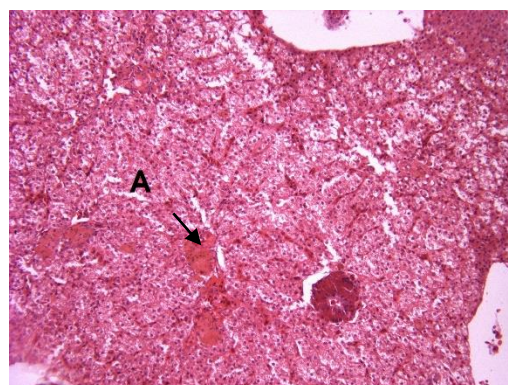
شکل ۴-۴-ج- ماهی‌ها این تیمار، ۳۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون در این بافت نیز، پرخونی سینوزوئیدهای کبدی (A) مشاهده شد. (شکل ۴-۴-ج).
در ۱۰ روز اول در معرض قرارگیری با سم دوز ۱ میلی گرم در لیتر، نکروز کانونی متوسطی در هپاتوسیتها دیده شد که با افزایش مدت زمان در معرض قرارگیری با سم، کم کم روند مزمن جراحات از قبیل هایپرپلازی مجاری صفراوی به همراه همبند فیروز دیده شد.



ب- آخر ۲۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم-پرخونی سینوزوئیدها



الف- آخر ۱۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم-پرخونی سینوزوئیدها و هایپر پلازی مجاری صفراوی



ج- آخر ۳۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم-پرخونی سینوزوئیدها
شکل ۴-۴- نتایج هیستوپاتولوژی حاصل از مطالعه بافت کبد در تیمار ۱

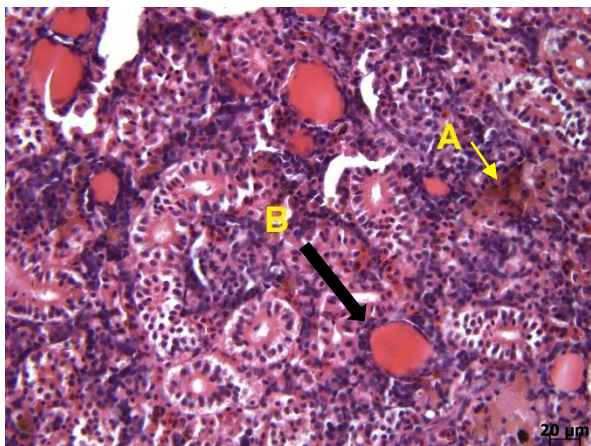
بافت کلیه در تیمار ۱

شکل ۴-۵-الف- ماهی‌های این تیمار، ۱۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون در این بافت پروتئینوری (B) در لومن لوله‌های ادراری، افزایش مراکز ملانوماکروفاژ (C) و دژنراسیون اپیتلیوم پوششی لوله‌های ادراری (A) مشاهده شد (شکل ۴-۵-الف).

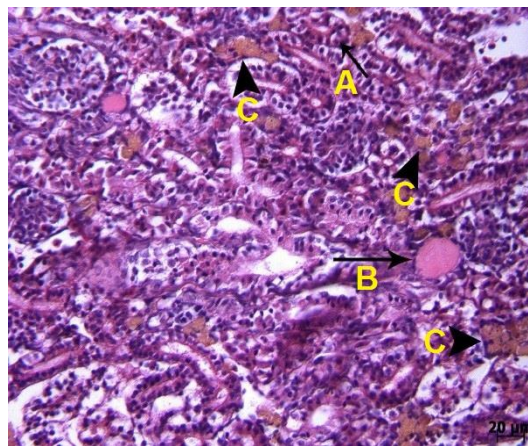
شکل ۴-۵-ب- ماهی‌های این تیمار، ۲۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون افزایش میزان پروتئینوری (B) و افزایش مراکز ملانوماکروفاژ (A) در بررسی میکروسکوپی مشاهده شد. (شکل ب، ۱)

همچنین پرخونی شدید عروقی (B) و افزایش در تعداد و سایز مراکز ملانوماکروفاژ (A) دیده شد. (شکل ب، ۲)

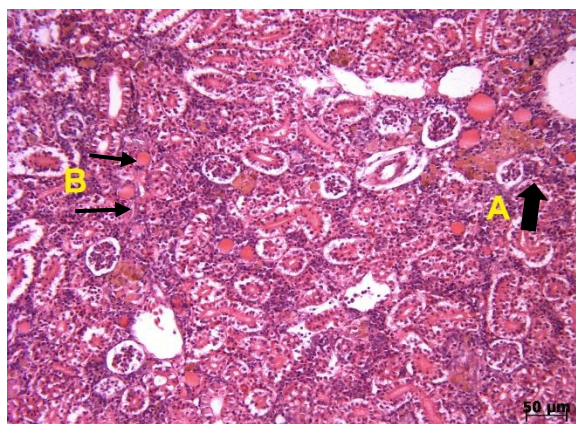
شکل ۴-۵-ج- ماهی‌های این تیمار، ۳۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون افزایش شدید پروتئینوری (B) در تعداد بیشتری از لوله‌های ادراری دیده شد. همچنین افزایش در تعداد و سایز مراکز ملانوماکروفاژ (A) در بررسی میکروسکوپی مشاهده شد (شکل ۴-۵-ج). در ۱۰ روز اول در معرض قرارگیری با سم دوز ۱ میلی گرم در لیتر، پروتئینوری و مراکز ملانوماکروفاژ دیده شدند که با افزایش مدت زمان در معرض قرارگیری با سم، افزایش پروتئینوری در تعداد بیشتری از لوله‌های ادراری و همچنین افزایش در تعداد و سایز مراکز ملانوماکروفاژ دیده شد.



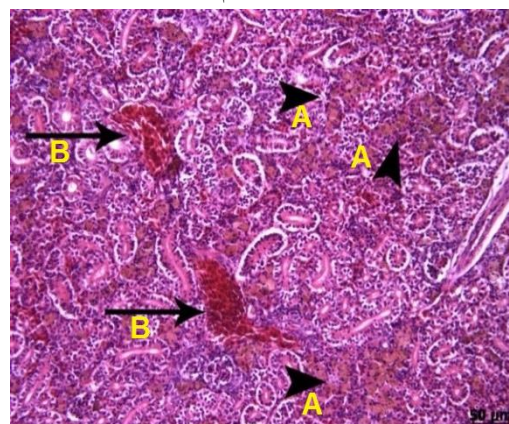
ب-۱- آخر ۲۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر، افزایش میزان پروتئینوری و افزایش مراکز ملانوماکروفاژ



الف-الف- آخر ۱۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر، پروتئینوری و دژنراسیون اپیتلیوم پوششی لوله های ادراری



ج- آخر ۳۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر - افزایش پروتئینوری



ب-۲- آخر ۲۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر، پرخونی شدید عروقی و افزایش مراکز ملانوماکروفاژ

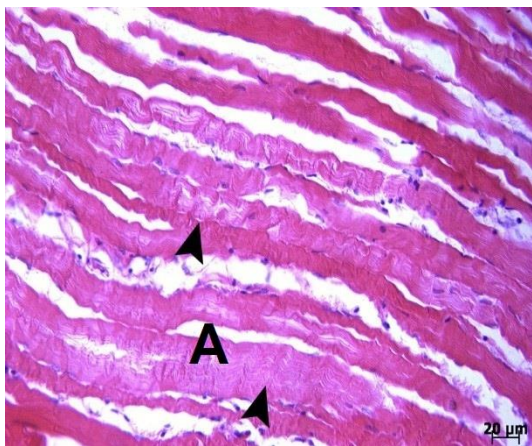
شکل ۴-۵- نتایج هیستوپاتولوژی بافت کلیه در تیمار ۱

بافت عضله در تیمار ۱

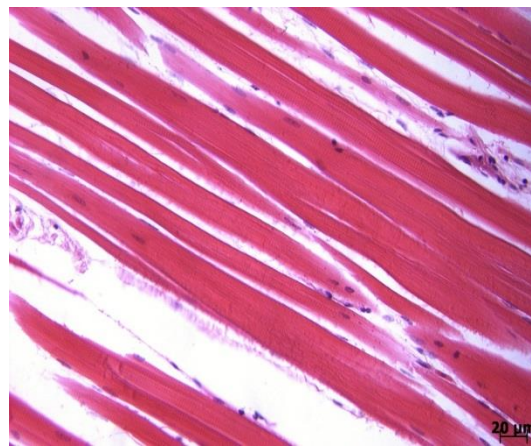
شکل ۴-۶-الف- ماهی های این تیمار، ۱۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون بافت عضله تقریباً نرمال بود.

شکل ۴-۶-ب- ماهی های این تیمار، آخر ۲۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون ساختار و قرارگیری میوفیبریل ها حالت طبیعی نداشت و واکوئله شدن، جداسدگی از هم و موجدار بودن (A) در تعداد زیادی از آنها دیده شد.

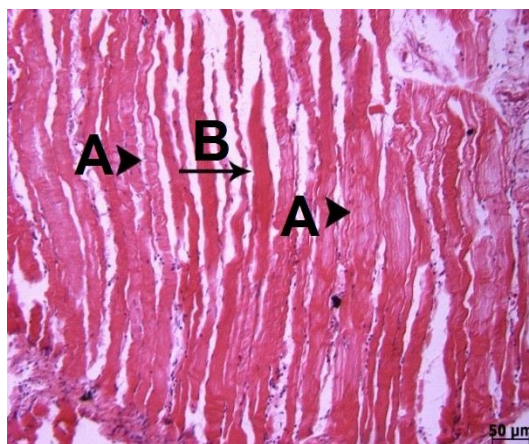
شکل ۴-۶-ج- ماهی های این تیمار، آخر ۳۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون در بررسی میکروسکوپی، اتوزینوفیلیک شدن سیتوپلاسم (B) و دژنراسیون در تعدادی از میوفیبریل های عضله مخطط اسکلتی دیده شد. همچنین ساختار و ترتیب قرارگیری میوفیبریل ها حالت طبیعی نداشت و واکوئله شدن، تکه تکه شدن، جداسدگی از هم و چروکیدگی (A) در تعداد زیادی از آنها دیده شد.



ب- آخر ۲۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم درلیتر - واکوئله و تکه
تکه شدن میوفیبریل ها



الف- آخر ۱۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم درلیتر -
بافت تقریباً نرمال



ج- آخر ۳۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم درلیتر-اثرزینوفیلیک شدن سیتوپلاسم
شکل ۴-۶- نتایج هیستوپاتولوژی بافت عضله در تیمار ۱

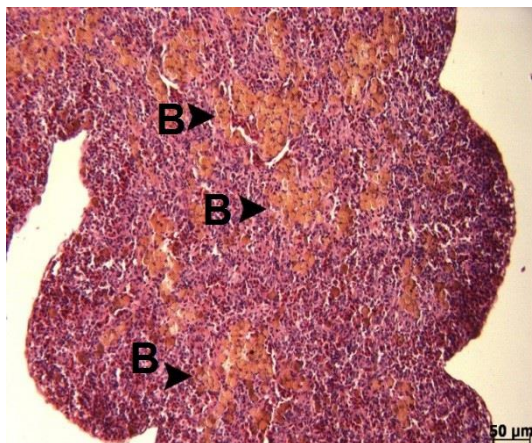
بافت طحال در تیمار ۱

شکل ۴-۷-الف- ماهی های این تیمار، آخر ۱۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون مراکز ملانوماکروفاژ (A) در نواحی مختلف بافت طحال دیده شد.

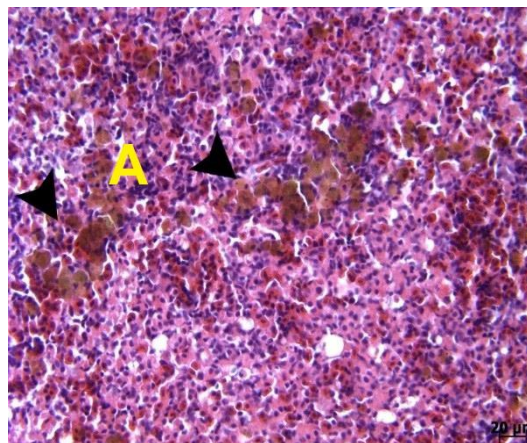
شکل ۴-۷-ب- ماهی های این تیمار، ۲۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون در این بافت، افزایش در سایز و تعداد مراکز ملانوماکروفاژ (B) در نواحی مختلف بافت طحال به خوبی دیده شد.

شکل ۴-۷-ج- ماهی های این تیمار، آخر ۳۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون در این بافت افزایش شدیدی در سایز و تعداد مراکز ملانوماکروفاژ (C) در نواحی مختلف بافت طحال به وضوح دیده شد.

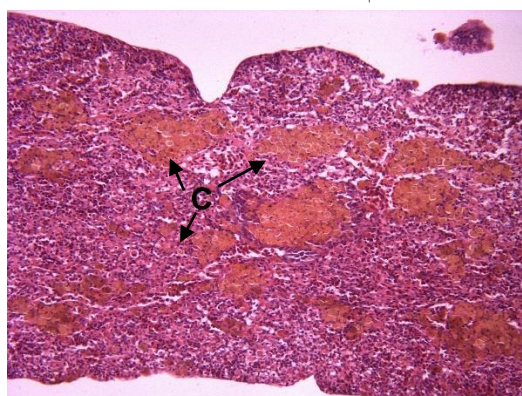
با افزایش مدت زمان در معرض قرارگیری در دوز ۱ میلی گرم در لیتر، شدت جراحات نیز در طحال بیشتر شد.



ب-آخر ۲۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر



الف-الف-آخر ۱۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر



ج-آخر ۳۰ روز اول با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر

شکل ۴-۷- نتایج هیستوپاتولوژی بافت طحال در تیمار ۱

در کل با توجه به بررسی نتایج هیستوپاتولوژی مقاطع بافتی در این پژوهش، شدت و میزان جراحات در هر گروه با افزایش در تعداد روزهای درگیری بیشتر شد. ناگفته نماند که به دنبال مزمن شدن روند در پایان دوره ۳۰ روزه در کبد در هر گروه، بافت فیروز جایگزین بافت نرمال کبد شد و میزان نکروز کمتر دیده شد ولی در بافت آبشش و عضله با افزایش تعداد روزهای درگیری شدت جراحات نیز بیشتر شد. در بافت کلیه و طحال هم بیشتر افزایش در تعداد و سایز مراکز ملانوماکروفاژ دیده شد که با مزمن شدن روند درگیری با سم بیشتر مشهود بود.

در یک نتیجه گیری کلی، شدت جراحات در گروه تیمار با دوز ۲ میلی گرم در لیتر بیشتر از گروه تیمار با دوز ۱/۵ میلی گرم در لیتر بود که در این گروه هم شدت جراحات از گروه تیمار با دوز ۱ میلی گرم در لیتر بیشتر بود. یعنی با کاهش دوز سم اکسادیازون، هم شدت جراحات کمتر شد.

۴-۷-۳- مقاطع بافتی تهیه شده از بافت‌های تیمار ۲

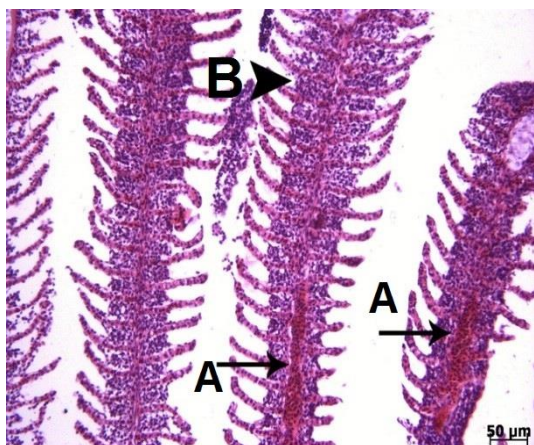
بافت آبشش در تیمار ۲

شکل ۴-۸-الف- ماهی‌های این تیمار، آخر ۱۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون

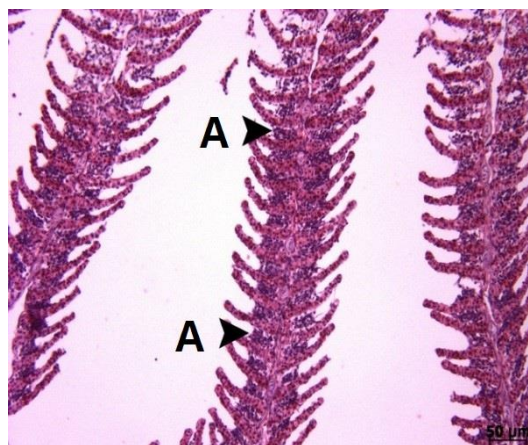
در بررسی میکروسکوپی این بافت، هایپرپلازی متوسط سلولهای اپیتلیوم لاملای ثانویه (A) مشاهده شد. شکل ۴-۸-ب- ماهی‌های این تیمار، آخر ۲۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون هایپرپلازی سلولهای اپیتلیوم لاملای ثانویه و نفوذ ماکروفاژها (B) و همچنین پرخونی شدید عروقی (A) در بررسی میکروسکوپی مشاهده شد.

شکل ۴-۸-ج- ماهی‌های این تیمار، آخر ۳۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون در این بافت هایپرپلازی شدید سلولهای اپیتلیوم لاملای ثانویه و نفوذ ماکروفاژها (C) دیده شد. به طوری که لاملاهای ثانویه بهم متصل شده بودند.

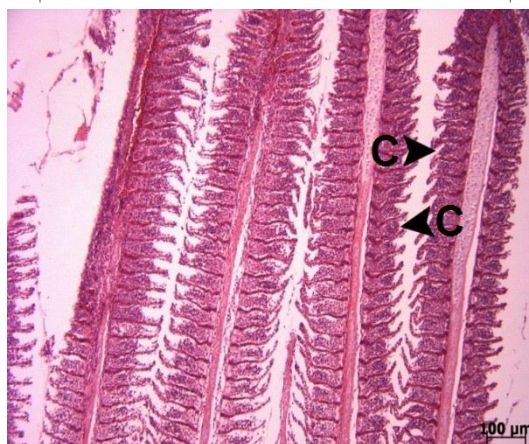
با افزایش در تعداد روزهای در معرض قرارگیری با سم اکسادیازون با غلظت دز ۱/۵ میلی گرم در لیتر، شدت جراحات وارد شده به بافت آبشش نیز بیشتر شده و در اغلب نواحی آبشش، لاملاهای ثانویه بهم متصل شده بودند. جراحات مشابه گروه تیمار با غلظت دز ۲ میلی گرم در لیتر از سم اکسادیازون بود ولی شدت جراحات کمتر مشاهده شد.



ب- آخر ۲۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر- هایپرپلازی سلول های اپیتلیوم لاملای ثانویه و نفوذ ماکروفاژها



الف- آخر ۱۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر- هایپرپلازی سلول های اپیتلیوم لاملای ثانویه



ج- آخر ۳۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر- هایپرپلازی سلول های اپیتلیوم لاملای ثانویه
شکل ۴-۸- نتایج هیستوپاتولوژی بافت آبشش در تیمار ۲

بافت کبد در تیمار ۲

شکل ۴-۹- الف- ماهی های این تیمار، آخر ۱۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر از سم

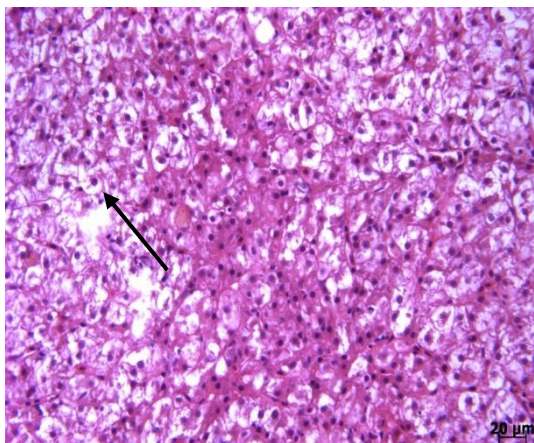
اکسادیازون

پرخونی عروقی (C) به همراه تشکیل فیبروز کم (A) در پارانشیم کبد دیده شد. همچنین تغییر چربی متوسطی (B) در سیتوپلاسم هپاتوسیتها به صورت واکوئل شدن مشاهده شد الف ۱. همچنین نکروز (فلش) (سیتوپلاسم ائوزینوفیلیک و هسته پیکنوزه و بازوفیلیک) هپاتوسیتها در قسمت وسیعی از مرکز تصویر دیده شد الف ۲.

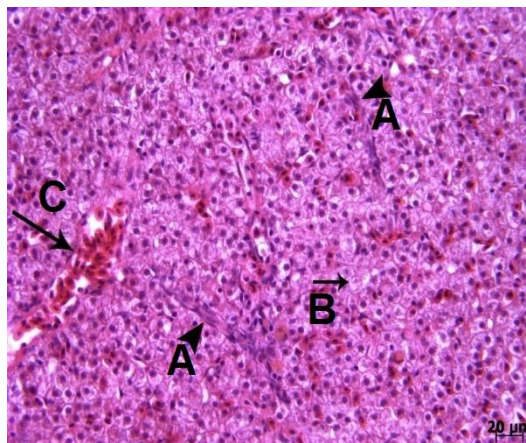
شکل ۴-۹- ب- ماهی های این تیمار، آخر ۲۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون نکروز (سیتوپلاسم ائوزینوفیلیک و هسته پیکنوزه و بازوفیلیک) کانونی در هپاتوسیتها (A) دیده شد. تجمعاتی از سلولهای التهابی تک هسته ای و فیبروسیتها (C) به همراه پرخونی عروقی (B) مشاهده شد. همچنین

تغییر چربی در تعدادی از هپاتوسیت‌های کبد (در سایر قسمت‌ها) به صورت واکوئله شدن سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها مشاهده شد.

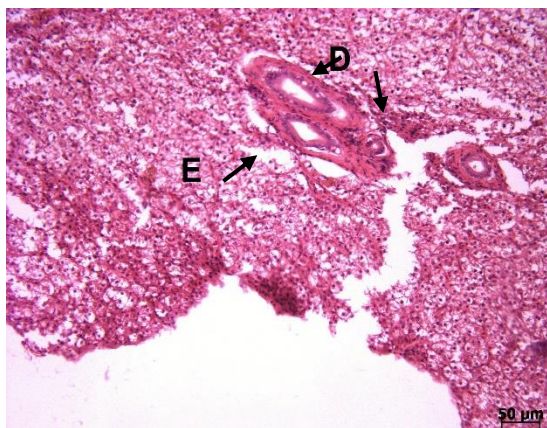
شکل ۴-۹-ج- ماهی‌های این تیمار، آخر ۳۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون با بررسی میکروسکوپی، جراحات مزمن در کبد به صورت هایپرپلازی مجاری صفراوی (D) دیده شد. همچنین نکروز هپاتوسیت‌های کبد (E) و تغییر چربی در سایر هپاتوسیت‌ها نیز دیده شد. جراحات در بافت کبد در گروه تیمار با غلظت دز ۱/۵ میلی گرم در لیتر از سم اکسادیازون، در ۱۰ روز اول، به صورت روند حاد و شدید همراه با نکروز زیاد بود، به طوری که در پایان ۲۰ روز مسمومیت، جراحات ادامه داشته و کم به سمت روند مزمن رفته و در بافت کبد، هایپرپلازی مجاری صفراوی و تشکیل همبند فیبروز مشاهده شد که در پایان ۳۰ روز میزان هایپرپلازی مجاری صفراوی و تشکیل همبند فیبروز به مراتب بیشتر بود. جراحات مشابه گروه تیمار با غلظت دز ۲ میلی گرم در لیتر از سم اکسادیازون بود ولی شدت جراحات کمتر مشاهده شد.



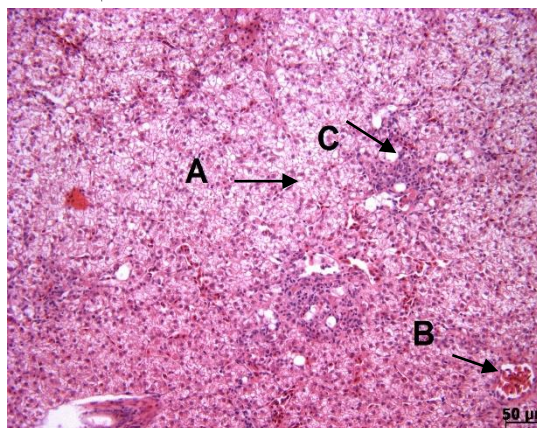
الف-۲- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر - نکروز
هپاتوسیت‌ها



الف-۱- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر -
پرخونی عروقی - تشکیل بافت فیبروز کم



ج- پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر-هایپر
پلازی مجاری صفراوی و نکروز هپاتوسیت‌ها



ب- پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر- نکروز
هپاتوسیت‌ها و تجمعات سلول‌های التهابی

شکل ۴-۹- نتایج هیستوپاتولوژی بافت کبد در تیمار ۲

بافت کلیه در تیمار ۲

شکل ۴-۱۰- الف- ماهی‌های این تیمار، آخر ۱۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سم

اکسادیازون

پروتئینوری (A) به صورت کست‌های ائوزینوفیلیک داخل لوله‌های ادراری در کلیه مشاهده گردید. خونریزی کم (B)، نکروز لوله ای ادراری (C) و دژنراسیون اپیتلیوم پوششی لوله‌های ادراری (E) مشاهده شد.

شکل ۴-۱۰- ب- ماهی‌های این تیمار، پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سم

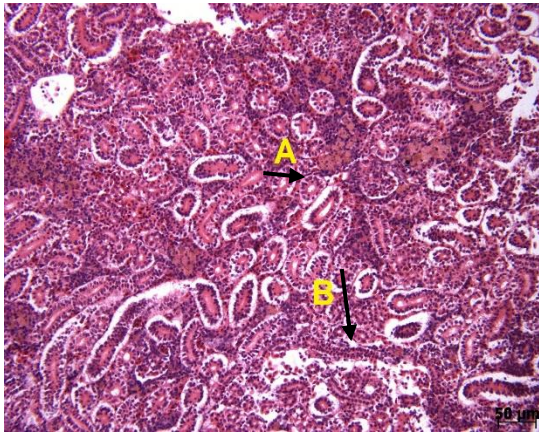
اکسادیازون

افزایش در تعداد مراکز ملانوماکروفاژ (A) و افزایش میزان نکروز اپیتلیوم پوششی لوله‌های ادراری (B) مشاهده شد.

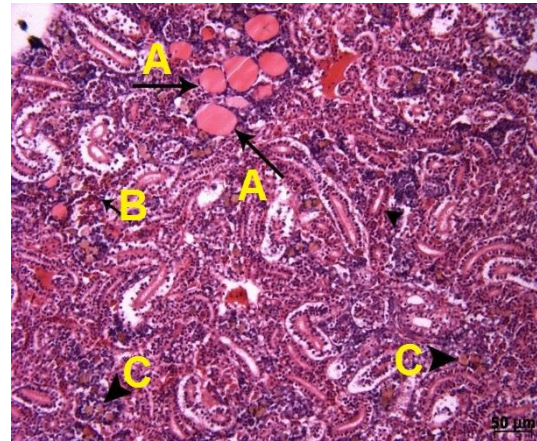
شکل ۴-۱۰-ج- ماهی‌های این تیمار، پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون

پروتئینوری (A) به صورت فضاهای ائوزینوفیلیک داخل لوله‌های ادراری به تعداد زیادی در کلیه مشاهده گردید ج ۱.

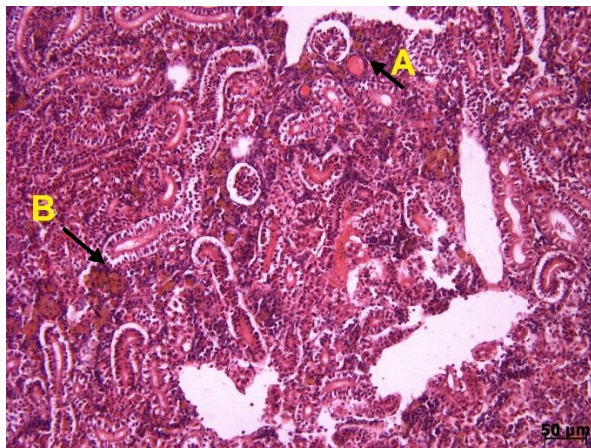
علاوه بر پروتئینوری (A)، افزایش در تعداد مراکز ملانوماکروفاژ (B) مشاهده گردید ج ۲. در ابتدای دوره، در ۱۰ روز اول، پروتئینوری، افزایش خیلی کمی در مراکز ملانوماکروفاژ و نکروز سلولهای اپیتلیوم پوششی لوله‌های ادراری دیده شد، ولی در پایان دوره ۲۰ روزه تعداد و سایز مراکز ملانوماکروفاژ بیشتر شد و نکروز سلولهای اپیتلیوم پوششی لوله‌هایی ادراری نیز نسبت به ۱۰ روز اول بیشتر دیده شد. در پایان دوره ۳۰ روزه، روند مزمن با افزایش در میزان پروتئینوری و افزایش تعداد و سایز مراکز ملانوماکروفاژ مشاهده شد. جراحات مشابه گروه تیمار با غلظت دوز ۲ میلی گرم در لیتر از سم اکسادیازون بود ولی شدت جراحات کمتر مشاهده شد و آسیب قابل توجهی به بافت بینابینی به جز خونریزی متوسط وارد نشده بود.



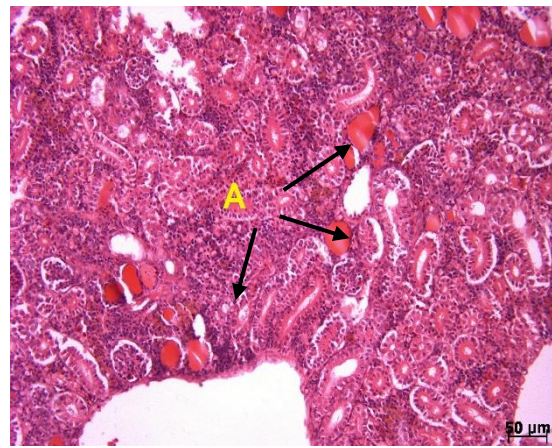
ب- پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر- افزایش تعداد مراکز ملانوماکروفاژ



الف- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر



ج- پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر- پروتئینوری به صورت کست های اتوزینوفیلیک داخل لوله های ادراری



ج- پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر- افزایش در تعداد مراکز ملانوماکروفاژ و افزایش میزان نکروز

شکل ۴-۱۰- نتایج هیستوپاتولوژی بافت کلیه در تیمار ۲

بافت عضله در تیمار ۲

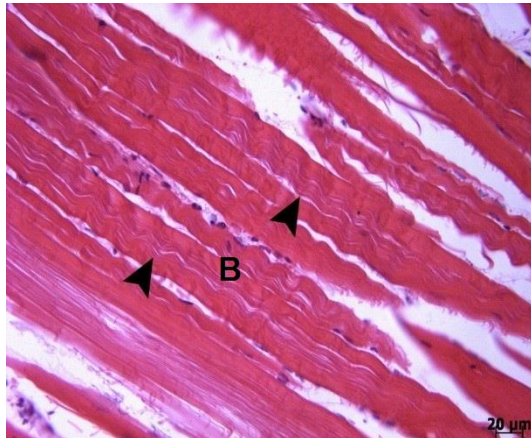
شکل ۴-۱۱- الف- ماهی های این تیمار، پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون تغییر بسیار جزئی در ساختار و نحوه قرارگیری میوفیبریل ها به علت واکوئله شدن (A) در آنها دیده شد.

شکل ۴-۱۱- ب- ماهی های این تیمار، پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون تغییر در ساختار و نحوه قرارگیری میوفیبریل ها به علت واکوئله شدن، موج دار شدن و چروکیدگی (B) دیده شد.

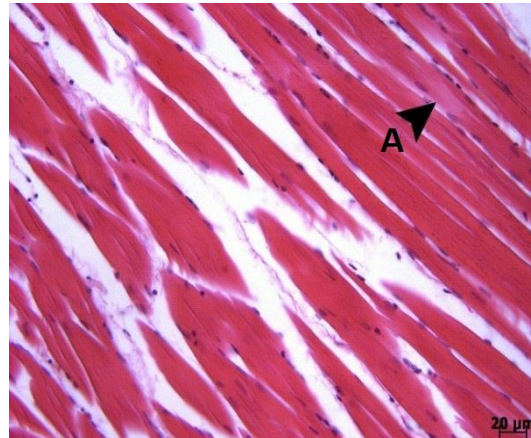
شکل ۴-۱۱- ج- ماهی های این تیمار، پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون

تغییرات در ساختار و نحوه قرارگیری میوفیبریل‌ها به علت واکوئل شدن و تخریب میوفیبریل‌ها (C) دیده شد.

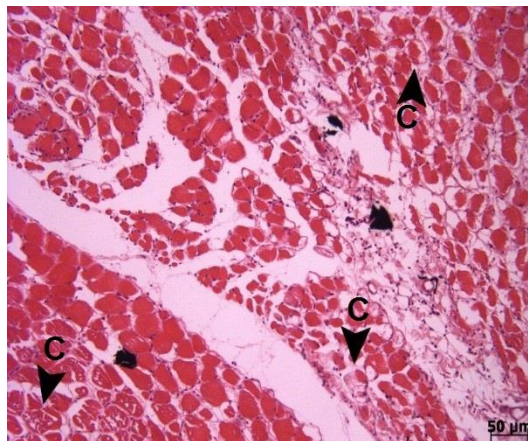
با افزایش مدت زمان در معرض قرارگیری با سم مذکور با دوز ۱/۵ میلی گرم در لیتر، از بین رفتن نحوه قرارگیری میوفیبریل‌ها به صورت واکوئل، تکه تکه و چروکیدگی دیده شد که در نهایت در پایان دوره ۳۰ روزه، تخریب بافت نرمال عضله اسکلتی مشاهده شد. جراحات مشابه گروه تیمار با دوز ۲ میلی گرم در لیتر از سم اکسادیازون بود ولی شدت جراحات به مراتب کمتر مشاهده شد.



ب- پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر - موج دار شدن و چروکیدگی میوفیبریل‌ها



الف- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر - تغییر جزئی در ساختار میوفیبریل‌ها



ج- ۳۰- پایان روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر - واکوئل شدن و تخریب میوفیبریل‌ها

شکل ۴-۱۱- نتایج هیستوپاتولوژی بافت عضله در تیمار ۲

بافت طحال در تیمار ۲

شکل ۴-۱۲-الف- ماهی‌های این تیمار، پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سم

اکسادیازون

افزایش کمی در تعداد مراکز ملانوماکروفاژ (A) دیده شد.

شکل ۴-۱۲-ب- ماهی‌های این تیمار، پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سم

اکسادیازون

افزایش متوسطی در تعداد مراکز ملانوماکروفاژ (B) دیده شد.

شکل ۴-۱۲-ج- ماهی‌های این تیمار، پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سم

اکسادیازون

افزایش زیادی در تعداد و سایز مراکز ملانوماکروفاژ (C) به وضوح دیده شد.

با افزایش مدت زمان در معرض قرارگیری با سم دوز ۱/۵ میلی گرم در لیتر و مزمن شدن روند مسمومیت،

افزایش شدیدی در سایز و تعداد مراکز ملانوماکروفاژ در بافت طحال دیده شد.

در کل با بررسی نتایج هیستوپاتولوژی مقاطع بافتی گروه تیمار با غلظت دز ۱/۵ میلی گرم در لیتر از سم

اکسادیازون، در ۱۰ روز اول جراحات حاد و متوسطی از قبیل نکروز و نفوذ ماکروفاژها و اتصال لاملاهای

ثانویه به هم در آبشش دیده شد که در پایان دوره ۳۰ روزه، جراحات به مراتب نسبت به ۱۰ روز اول

بیشتر بود، به طوری که در پایان دوره ۳۰ روزه، روند جراحات مزمن بود و شدت جراحات در آبشش بیشتر

از روزهای اول دیده شد و در بافت کبد علاوه بر نکروز هپاتوسیتها در ۱۰ روز اول، افزایش نفوذ بافت فیروز

و هایپرپلازی متوسط مجاری صفراوی تا پایان دوره ۳۰ روزه دیده شد و در بافت طحال نیز افزایش در تعداد

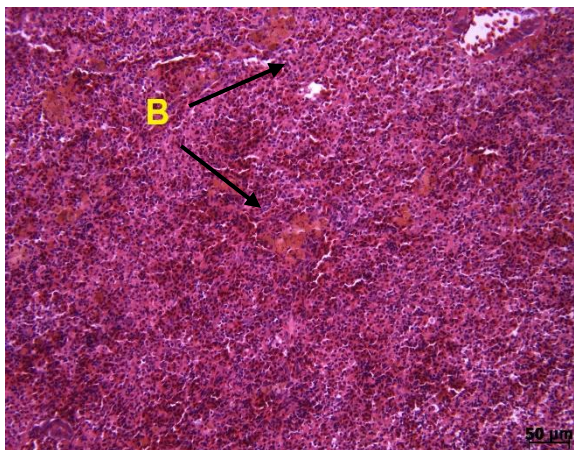
و سایز مراکز ملانوماکروفاژ تا پایان دوره تغییر قابل توجه بود. همچنین در بافت کلیه، افزایش پروتئینوری،

افزایش مراکز ملانوماکروفاژ و نکروز سلولهای اپیتلیوم پوششی لوله تا پایان دوره ۳۰ روزه مشاهده شد. در

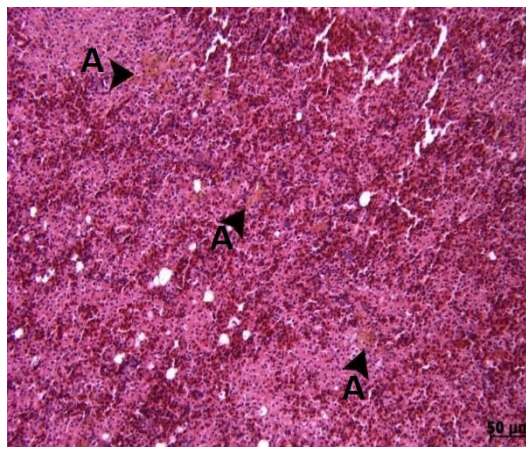
بافت عضله هم شدت جراحات با افزایش تعداد روزهای در معرض قرارگیری بیشتر بود. در کل جراحات

مشابه گروه تیمار با غلظت دز ۲ میلی گرم در لیتر از سم اکسادیازون بود ولی شدت جراحات در هر پنج بافت

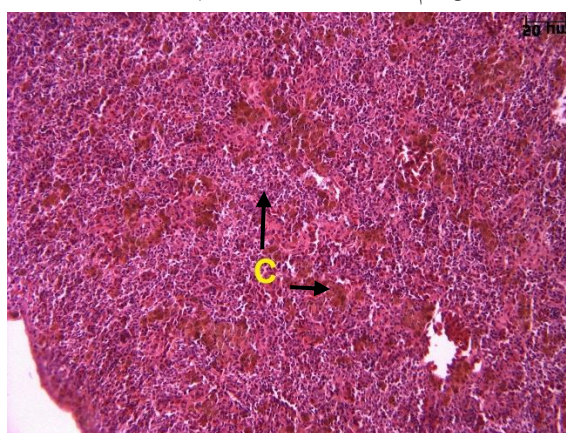
مورد مطالعه کمتر از گروه تیمار با غلظت دوز ۲ میلی گرم در لیتر مشاهده شد.



ب- پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر



الف- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر



ج- پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۱/۵ میلی گرم

شکل ۴-۱۲- نتایج هیستوپاتولوژی بافت طحال در تیمار ۲

۴-۷-۴- مقاطع بافتی تهیه شده از بافت‌های تیمار ۳

بافت آبشش در تیمار ۳

شکل ۴-۱۳- الف- ماهی‌های این تیمار، پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم

اکسادیازون

الف ۱- در بررسی میکروسکوپی مقاطع هیستوپاتولوژی بافت آبشش، پرخونی شدید عروقی (A)، هیپرپلازی سلولهای اپیتلیوم لاملای ثانویه و نفوذ ماکروفاژها (B) مشاهده شد.

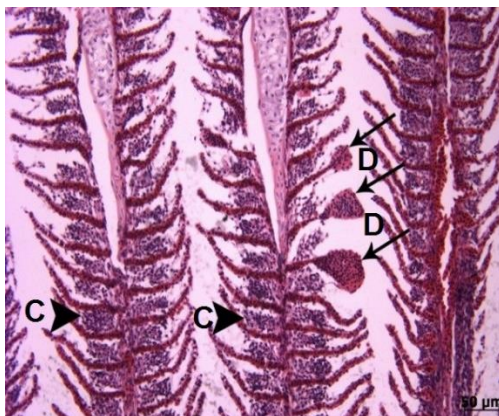
الف ۲- علاوه بر هیپرپلازی سلولهای اپیتلیوم لاملای ثانویه و نفوذ ماکروفاژها (C)، آنوريسم (اتساع عروقی) (D) متوسطی نیز دیده شد.

شکل ۴-۱۳- ب- ماهی‌های این تیمار، پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون

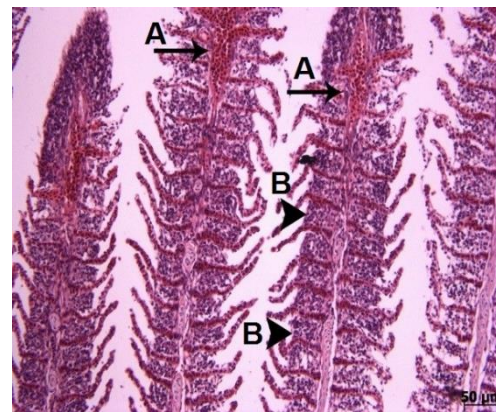
در ماهیان مورد مطالعه بعد از ۲۰ روز در معرض قرارگیری با سم مذکور، افزایش بیشتری در هایپرپلازی سلولهای اپیتلیوم لاملای ثانویه و نفوذ سلولهای التهابی (E) و نکروز آنها دیده شد. لذا شدت تخریب به مراتب بیشتر از ۱۰ روز اول مشاهده شد.

شکل ۴-۱۳-ج- ماهی های این تیمار، پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون
 ماهیان مورد مطالعه در پایان دوره ۳۰ روزه، افزایش بیشتری در هایپرپلازی سلولهای اپیتلیوم لاملای ثانویه و نفوذ ماکروفاژها (G) و نکروز آنها دیده شد، به طوری که حتی بعضی از لاملاهای ثانویه آبشش دچار تخریب شده بودند و فقط تجمعاتی از نفوذ سلولهای التهابی و ضایعات سلولهای مرده (F) روی لاملای اولیه دیده شد.

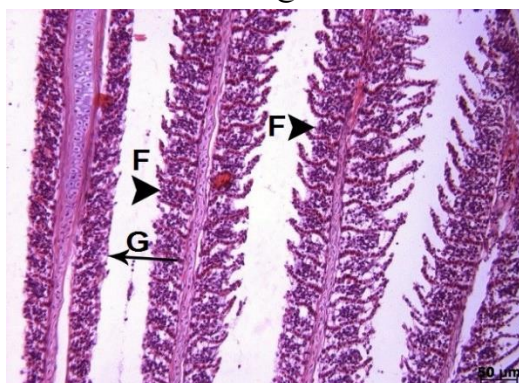
با افزایش در تعداد روزهای در معرض قرارگیری با سم اکسادیازون دوز ۲ میلی گرم در لیتر، شدت جراحات وارد شده به بافت آبشش نیز بیشتر شده به طوری که در پایان دوره ۳۰ روزه در اغلب نواحی از آبشش ساختار طبیعی لاملاهای ثانویه و اپیتلیوم پوششی آنها از بین رفته بود.



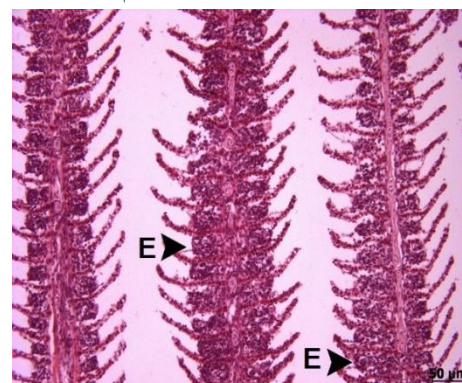
الف ۲- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر- آنوریسم (اتساع عروقی)



الف ۱- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر- پرخونی شدید عروقی هایپرپلازی سلولهای اپیتلیوم لاملای ثانویه



ج- پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر- نفوذ ماکروفاژها و تجمعاتی از سلول های مرده



ب- پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر- نفوذ سلول های التهابی و هایپر پلازی

شکل ۴-۱۳- نتایج هیستوپاتولوژی حاصل از مطالعه بافت آبشش در تیمار ۳

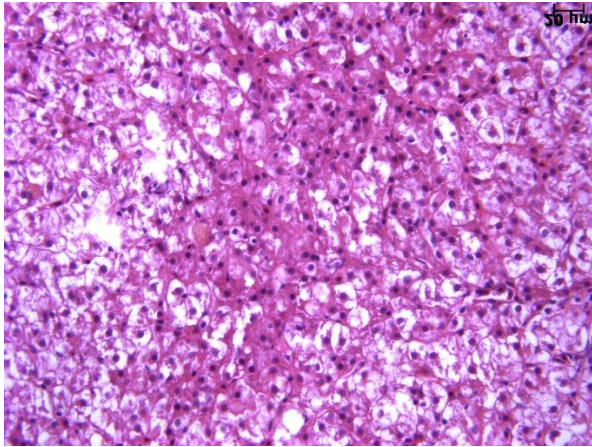
بافت کبد تیمار ۳

شکل ۴-۱۴-الف- ماهی‌های این تیمار، پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون نکروز یا همان مرگ سلولی (سیتوپلاسم ائوزینوفیلیک و هسته پیکنوزه و بازوفیلیک) وسیع در هپاتوسیتها (A) به صورت کانونی و منتشر دیده شد. همچنین تغییر چربی (B) در تعداد زیادی از هپاتوسیت‌های کبد به صورت واکوئله شدن سیتوپلاسم هپاتوسیتها مشاهده شد (الف ۱). در بزرگنمایی بیشتر، فقط پرخونی سینوزوئیدها دیده شد (الف ۲). همچنین افزایش متوسطی در سائز مراکز ملانوماکروفاژ (C) دیده شد. تشکیل فیروز (D) حاوی رشته‌های کلاژن و فیبروسیت‌ها در نواحی کمی از بافت کبد مشاهده شد. تغییر چربی (E) در تعداد زیادی از هپاتوسیتها دیده شد (الف ۳).

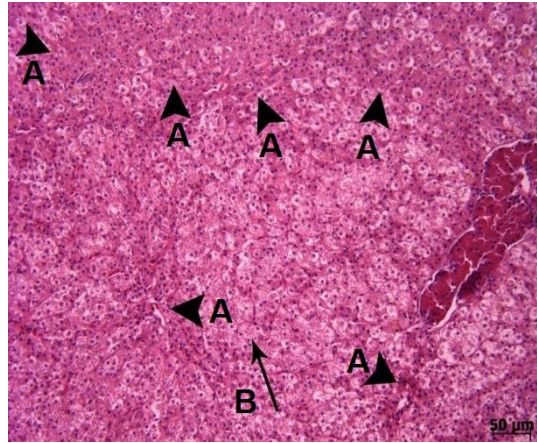
شکل ۴-۱۴-ب- ماهی‌های این تیمار، پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون هایپرپلازی مجاری صفراوی (A) و تشکیل فیروز (B) حاوی رشته‌های کلاژن و فیبروسیت‌ها در نواحی از بافت کبد مشاهده شد. تغییر چربی (C) در تعداد زیادی از هپاتوسیتها دیده شد.

شکل ۴-۱۴-ج- ماهی‌های این تیمار، پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون در پایان دوره، در بافت کبد، تغییر چربی مشاهده شد. البته تشکیل فیروز و هایپرپلازی مجاری صفراوی (D) به مراتب بیشتر بود.

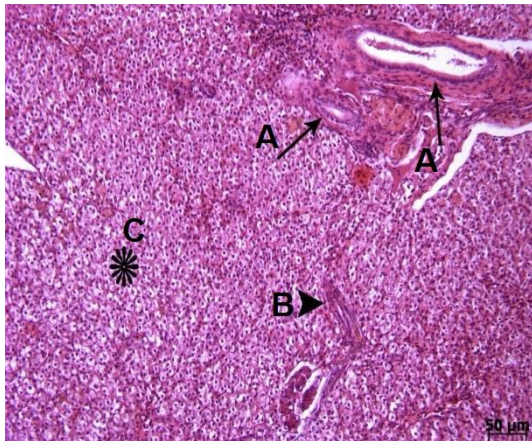
در ابتدای دوره، در ۱۰ روز اول، افزایش حاد و شدیدی در نکروز هپاتوسیتها به صورت کانونی و منتشر مشاهده شد که با افزایش روزهای در معرض قرارگیری با سم مذکور با دوز ۲ میلی گرم در لیتر رفته رفته روند مزمن شده و با تشکیل فیروز و هایپرپلازی مجاری صفراوی کم کم بافت نرمال کبد جای خود را به بافت همبند فیروز داد.



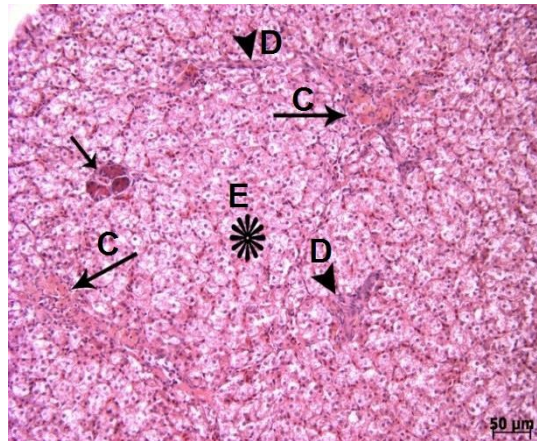
الف ۲- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر- پرخونی
سینوزوئیدها



الف ۱- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر- نکروز
وسیع در هپاتوسیتها



ب- پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر- هایپرپلازی
مجاری صفراوی و تغییر چربی



الف ۳- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر-
افزایش متوسط در سائز مراکز ملانوماکروفاژ و تشکیل بافت
فیبروز حاوی رشته های کلاژن و فیبروسیت ها



ج- پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر- تشکیل فیبروز
و هایپرپلازی مجاری صفراوی

شکل ۴-۱۴- نتایج هیستوپاتولوژی بافت کبد در تیمار ۳

بافت کلیه در تیمار ۳

شکل ۴-۱۵-الف- ماهی‌های این تیمار، پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم

اکسادیازون

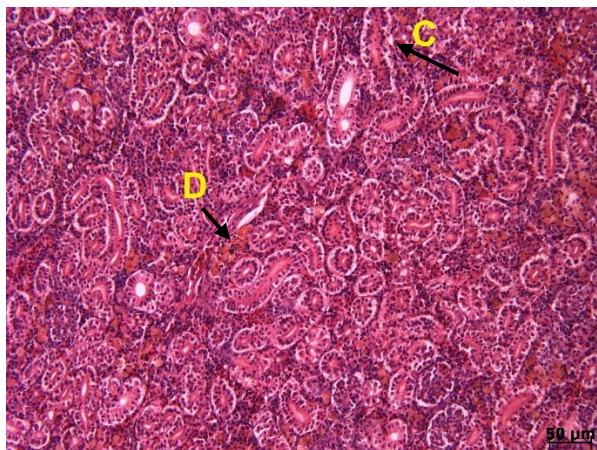
در بررسی میکروسکوپی، خونریزی شدیدی (A) در بافت پارانشیم کلیه‌ها دیده شد الف ۱. همچنین دژنراسیون سلولهای اپیتلیوم پوششی لوله‌های ادراری (C) و افزایش در تعداد مراکز ملانوماکروفاژ (D) مشاهده گردید الف ۲. در بزرگنمایی بیشتر، مراکز ملانوماکروفاژ (E) به خوبی قابل رویت بودند الف ۳.

شکل ۴-۱۵-ب- ماهی‌های این تیمار، پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون

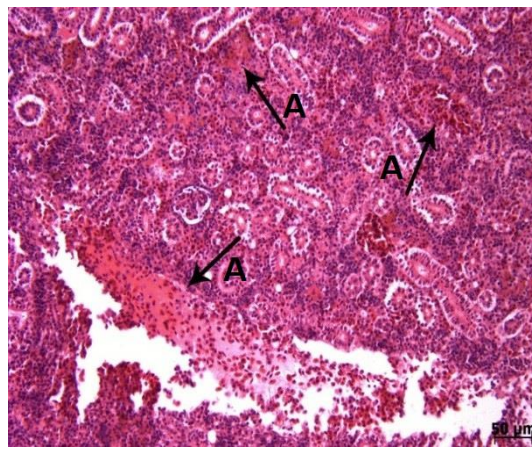
در لوله‌های ادراری بافت کلیه بعد از ۲۰ روز در معرض قرارگیری با سم، پروتئینوری (F) به صورت فضاهای ائوزینوفیلیک و یکدست دیده شدند. همچنین افزایش متوسطی در سائز مراکز ملانوماکروفاژها (G) دیده شد.

شکل ۴-۱۵-ج- ماهی‌های این تیمار، پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون

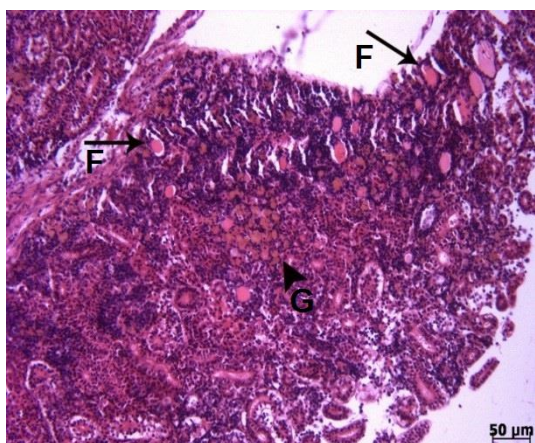
افزایش در نکروز سلولهای اپیتلیوم پوششی لوله‌های ادراری (K) و افزایش در تعداد و سائز مراکز ملانوماکروفاژ (J) مشاهده گردید. همچنین تخریب بافت بینابینی کلیه (علامت ستاره) نیز مشاهده شد. در ابتدای دوره، در ۱۰ روز اول، خونریزی در بافت بینابینی و افزایش خیلی کمی در تعداد مراکز ملانوماکروفاژ دیده شد، ولی در پایان دوره ۲۰ روزه تعداد و سائز مراکز ملانوماکروفاژ بیشتر شد و نکروز سلولهای اپیتلیوم پوششی لوله‌های ادراری نیز نسبت به ۱۰ روز اول بیشتر دیده شدند. از طرفی در پایان دوره ۳۰ روزه علاوه بر شدت گرفتن جراحات مذکور، نکروز و تخریب در بافت بینابینی کلیه نیز مشاهده شد. در کل با افزایش تعداد روزهای در معرض قرارگیری با سم مذکور با دوز ۲ میلی گرم در لیتر شدت جراحات نیز افزایش یافت.



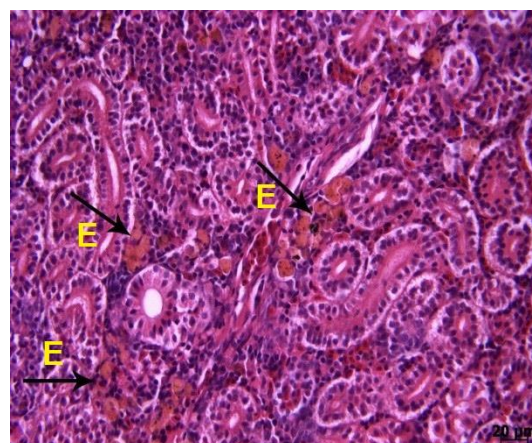
الف ۲- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر- نکروز سلولهای اپیتلیوم پوششی لوله‌های ادراری و افزایش در تعداد مراکز ملانوماکروفاژ



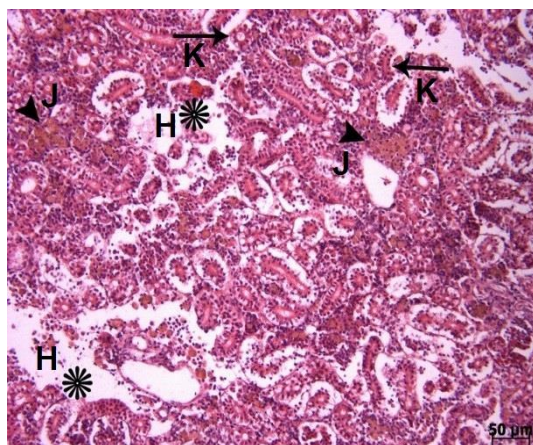
الف ۱- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر- خونریزی شدیدی در بافت پارانشیم



ب-پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر -پروتئینوری به صورت فضاهای ابوزینوفیلیک



الف ۳- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر- وجود مراکز ملانوماکروفاژ



ج- پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم-تخریب بافت بینابینی
شکل ۴-۱۵- نتایج هیستوپاتولوژی بافت کلیه در تیمار ۳

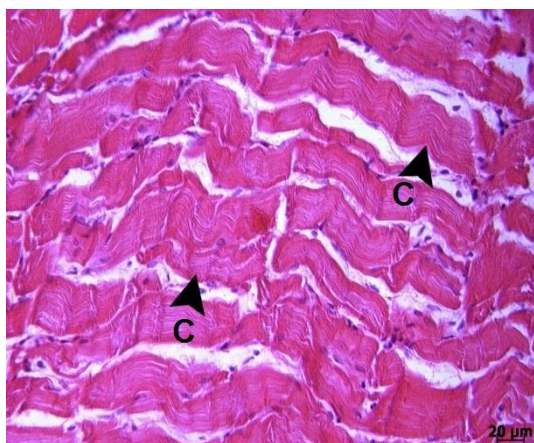
بافت عضله در تیمار ۳

شکل ۴-۱۶-الف- ماهی‌های این تیمار، پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون ائوزینوفیلیک شدن سیتوپلاسم میوفیبریل‌های عضله مخطط اسکلتی و متعاقباً نکروز (A) مشاهده شد. همچنین از بین رفتن نحوه قرارگیری میوفیبریل‌ها به صورت واکوئله شدن، تکه تکه شدن، چروکیدگی و موجدار شدن (B) دیده شد.

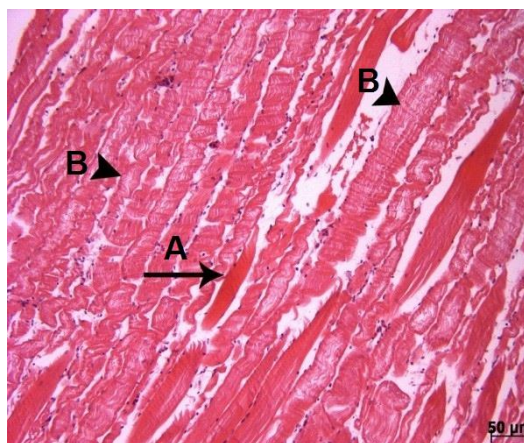
شکل ۴-۱۶-ب- ماهی‌های این تیمار، پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون میوفیبریل‌ها نسبت به ۱۰ روز اول، با شدت بیشتری به صورت واکوئله، تکه تکه، چروکیده و موجدار (C) دیده شدند.

شکل ۴-۱۶-ج- ماهی‌های این تیمار، پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون افزایش تخریب میوفیبریل‌ها و تکه تکه شدن آنها و نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای (D) در محل جراحت دیده شد.

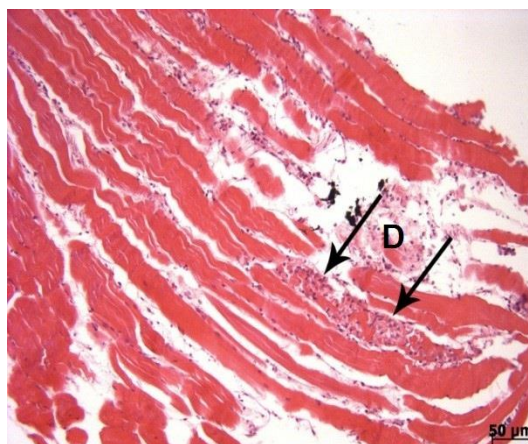
با افزایش مدت زمان در معرض قرارگیری با سم مذکور با دوز ۲ میلی گرم در لیتر، ائوزینوفیلیک شدن سیتوپلاسم میوفیبریل‌های عضله مخطط اسکلتی و متعاقباً نکروز، از بین رفتن نحوه قرارگیری میوفیبریل‌ها به صورت واکوئله شدن، تکه تکه شدن و موجدار شدن دید شد که در نهایت در پایان دوره ۳۰ روزه، تخریب بافت نرمال عضله مخطط اسکلتی مشاهده شد.



ب- پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر- تکه تکه شدن و موج دار شدن میوفیبریل ها



الف- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر- اتوزینوفیلیک شدن سیتوپلاسم میوفیبریل ها



ج- پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر - افزایش تخریب میوفیبریل ها
شکل ۴-۱۶- نتایج هیستوپاتولوژی بافت عضله در تیمار ۳

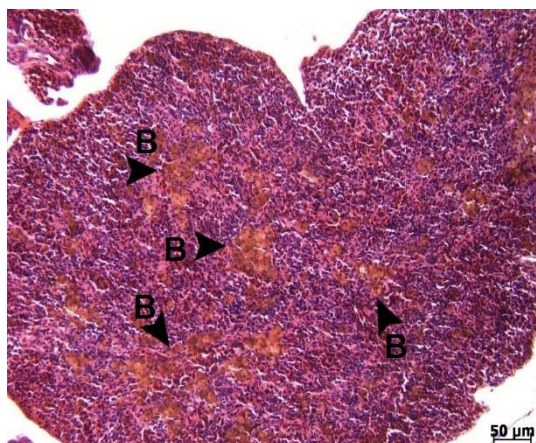
بافت طحال تیمار ۳

شکل ۴-۱۷- الف- ماهی های این تیمار، پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون افزایش در سایز و تعداد مراکز ملانوماکروفاژ (A) دیده شد.

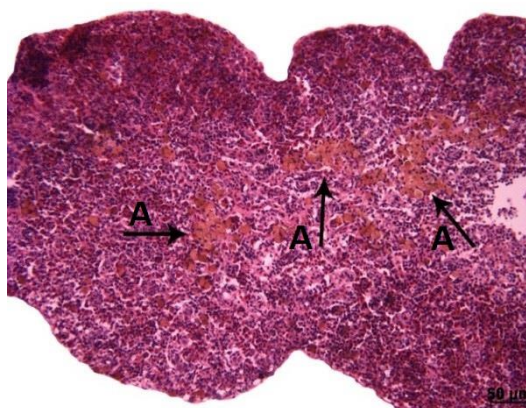
شکل ۴-۱۷- ب- ماهی های این تیمار، پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون افزایش متوسطی در سایز و تعداد مراکز ملانوماکروفاژ (B) دیده شد.

شکل ۴-۱۷- ج- ماهی های این تیمار، پایان ۳۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر سم اکسادیازون افزایش شدیدی در سایز و تعداد مراکز ملانوماکروفاژ (C) در اغلب نواحی بافت طحال به وضوح دیده شد. با افزایش مدت زمان در معرض قرارگیری با سم مذکور با دوز ۲ میلی گرم در لیتر و مزمن شدن روند مسمومیت، افزایش شدیدی در سایز و تعداد مراکز ملانوماکروفاژ در بافت طحال دیده شد.

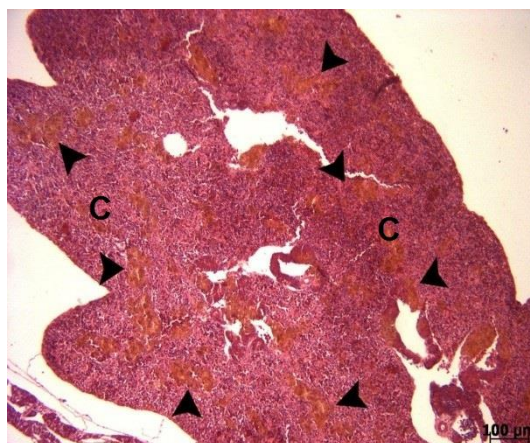
در کل با بررسی نتایج هیستوپاتولوژی مقاطع بافتی گروه تیمار دوز ۲ میلی گرم در لیتر از سم اکسادیازون، در ۱۰ روز اول جراحات حاد و شدیدی از قبیل نکروز و نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای به ویژه در آبشش ها دیده شد که در پایان ۲۰ روز از مسمومیت، جراحات به مراتب نسبت به ۱۰ روز اول بیشتر بوده به طوری که در پایان دوره ۳۰ روزه، روند جراحات مزمن بود که در بافت کبد با نفوذ بافت فیروز و هایپرپلازی مجاری صفراوی دیده شد و در بافت طحال نیز افزایش شدید در تعداد و سایز مراکز ملانوماکروفاژ مشاهده شد. البته ناگفته نماند که با افزایش در تعداد روزهای در معرض قرارگیری، شدیدترین جراحات در بافت آبشش و متعاقباً در بافت کلیه مشاهده گردید.



ب- پایان ۲۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر - افزایش بیشتر مراکز ملانوماکروفاژ



الف- پایان ۱۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر - افزایش در تعداد مراکز ملانوماکروفاژ

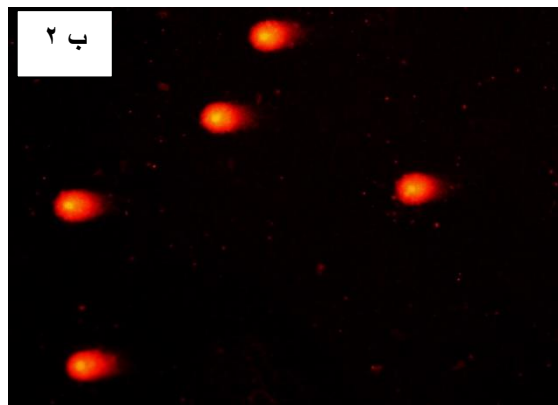
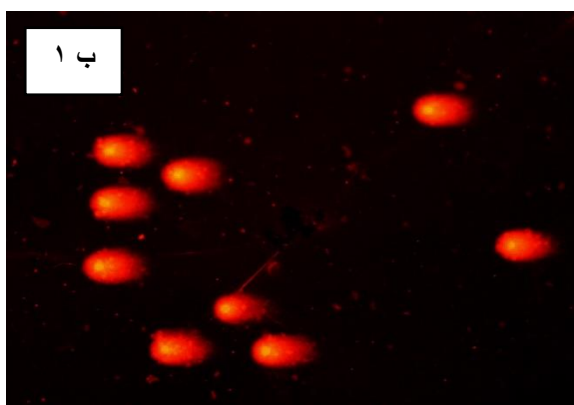
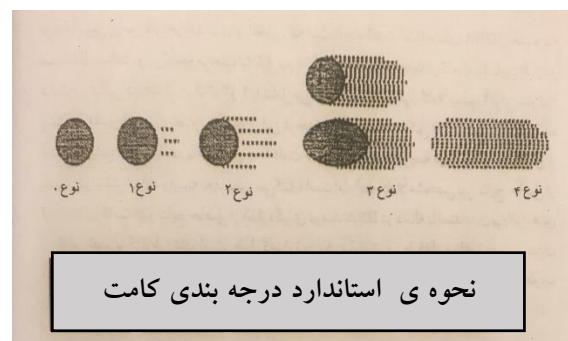
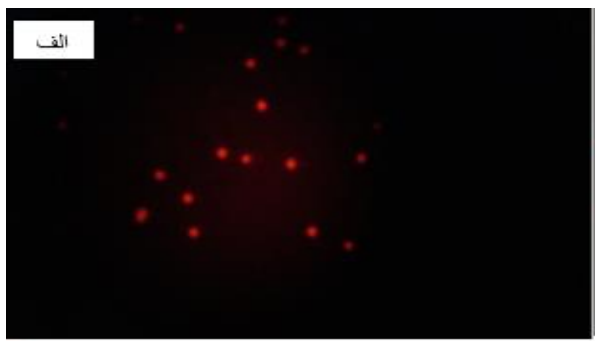


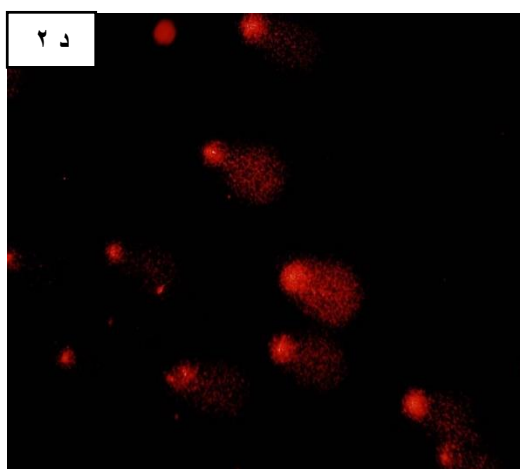
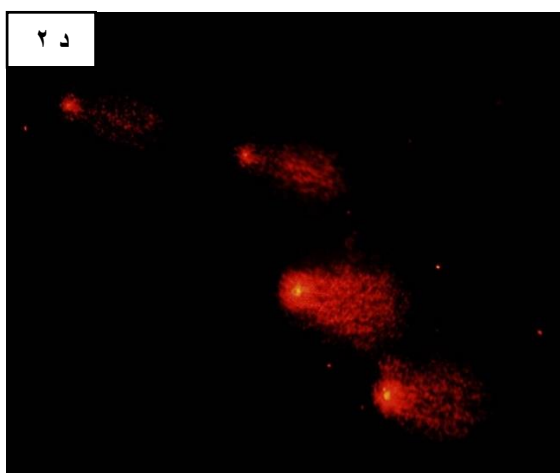
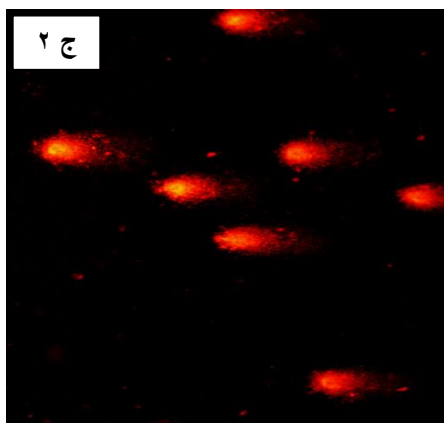
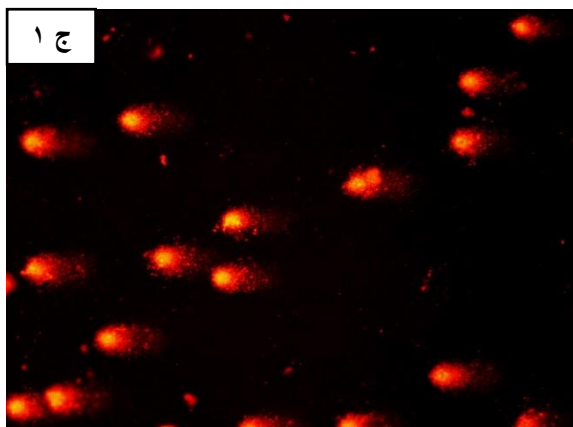
ج- ۳۰ روز اول با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر - افزایش شدید در تعداد مراکز ملانوماکروفاژ
شکل ۴-۱۷- نتایج هیستوپاتولوژی بافت طحال در تیمار ۳

۱-۱- سنجش تخریب DNA

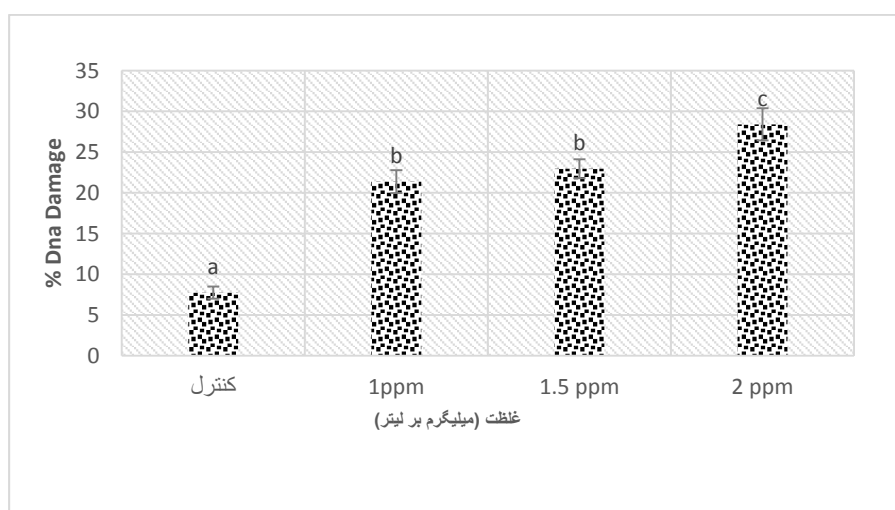
میزان آسیب DNA اندازه گیری شده در بافت خون ماهیان گروه شاهد و تحت تیمار سم در نمودار ۴-۹ به صورت درصد DNA دنباله دار ارائه شده است. آزمایش بقای سلولی، بقای بالاتر از ۸۰ درصد شرط لازم برای انجام سنجش کامت برای گلبول‌های قرمز می‌باشد. متوسط تخریب DNA در سلول‌های گلبول قرمز تیمار شاهد به میزان ۷/۷۵ درصد سنجش شد. نتایج نشان دادند که تیمار ماهی‌های در معرض سم، افزایش تخریب DNA معنی‌داری نسبت به ماهی‌های تیمار شاهد بدون سم داشتند. اثر سم و غلظت‌های متفاوت آن بر میزان بروز سطح تخریب DNA گلبول‌های قرمز معنی‌دار بود (شکل ۴-۱۸)

همچنین روند افزایش معنی‌دار سطح تخریب DNA در گلبول‌های قرمز ماهیان تحت تیمار علف کش اکسادiazon، با توجه به غلظت‌های سم بین بعضی از تیمارها مشهود بود، به نوعی که بیشترین میزان تخریب در غلظت تحت کشنده ۲ میلی‌گرم در لیتر ۲۸/۴ درصد و سپس بترتیب در غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ۲۱/۳ و ۲۲/۹ درصد مشاهده شد (نمودار ۴-۹). درحالی‌که تفاوت معنی‌داری در سطح ($p < 0.05$) بین تیمار ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده نشد، نتایج هردو تیمار با نتایج تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار داشتند (نمودار ۴-۹).





شکل ۴-۱۸ - DNA گلبول قرمز ماهی کپور وحشی تیمار شاهد (الف) ، DNA گلبول قرمز در معرض غلظت‌های علفکش اکسادیازون ۱ میلی‌گرم در لیتر (ب و ۲) ، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر (ج ۱ و ۲) و ۲ میلی‌گرم در لیتر (د ۱ و ۲) ، در روز ۳۰ پس از شروع آزمایش



نمودار ۴-۹ - اثرات غلظت‌های اکسادیازون (۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بر نوسانات آسیب DNA (بصورت % DNA دنباله) در سلول‌های خون ماهی کپور وحشی در روز ۳۰ پس از شروع آزمایش (حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ می‌باشد).

بحث

امروزه باتوجه به توسعه صنعت و پیشرفت کشاورزی، سموم کشاورزی متعددی تولید شده که با شیوه‌های مختلف در مزارع به کار می‌روند که البته اثرات سوئی نیز بر اکوسیستم اطراف باقی می‌گذارند. کاربرد گسترده انواع سموم شیمیایی با طیف وسیع و پایداری زیاد طی دهه‌های اخیر، بشر را با بحران متعدد زیست محیطی روبرو ساخته و موجب به خطر افتادن انسان‌ها و سایر موجودات زنده، آلودگی آب و خاک و منابع غذایی، نابودی حشرات مفید و سایر دشمنان طبیعی و مقاوت فزاینده نسبت به این سموم گردیده است. از جمله محیط‌هایی که در معرض خطرات استفاده از سموم قرار دارد، محیط‌های آبی می‌باشند. آبریان هم به خاطر زندگی دایمی در این محیط‌ها، پیوسته در معرض تماس با این آلاینده‌ها می‌باشند. سموم حشره‌کش یکی از مهم ترین آلاینده‌های اکوسیستم‌های آبی محسوب می‌شوند و معمولاً از طریق مصرف در مزارع، باعث بروز آسیب‌های شدید در جوامع آبریان و اکوسیستم‌ها می‌شوند (Van der Oost et al., 2003). علف‌کش اکسادیازون بافرمول بسته ی $O3C15H18CL2N2$ و نام تجاری رونستار، علف‌کش پیش رویشی است که برای کنترل گیاهان یک‌ساله پهن‌برگ و باریک برگ استفاده می‌شود. این علف‌کش توسط کمیته مقاومت در برابر علف‌کش‌ها (HRAC)^۱ در گروه E قرار گرفته است و پروتئوپورفینین IX اکسیداز (PROTOX) را مهار می‌کند که آخرین آنزیم رایج در سنتز کلروفیل می‌باشد (Stephenson and Solomon, 2007). بر این اساس انتخاب این سم برای گیاهان به دلیل کاهش متابولیسم و یا کاهش دفع آن نسبت به حیوانات می‌باشد.

۴-۹-۱- سمیت حاد

استفاده از آفت‌کش‌ها به خصوص علف‌کش‌ها و بقایای آن‌ها در محیط‌های آبی، یک مشکل بزرگ برای محیط زیست می‌باشد. قرار گرفتن ارگانیسم‌ها در معرض غلظت حاد این سموم، درک بهتری از سطح خطرناک بودن این مواد شیمیایی را به وجود می‌آورد (Lemly, 2002). ارزیابی خطرات زیست محیطی در غلظت‌های پایین برای موجودات غیر هدف ضروری است. در مطالعات سم‌شناسی، سمیت حاد معمولاً برای پیش بینی میزان خطرناک بودن آفت‌کش‌ها در موجودات غیر هدف انجام می‌گیرد (Comoretto et al., 2007).

بر اساس بررسی حاضر، میزان سمیت حاد اکسادیازون، غلظت نیمه کشنده ۹۶ ساعته ($LC_{50} h96$) آن $3/4$ میلی گرم در لیتر به دست آمد. تا کنون هیچ گونه مطالعه ای روی تاثیر سم اکسادیازون روی ماهی کپور دریایی صورت نگرفته است. برای برخی آبریان LC_{50} (سمیت حاد) آن $0/1$ تا 1 میلی گرم در لیتر گزارش شده است (Washington State Department of Transportation). همچنین LC_{50} برای مهار پروتئوپورفینین اکسیداز به وسیله علف‌کش ۵ درصد اکسادیازون $0/241$ میلی گرم در لیتر برای ماهی بدست آمده است (AL-SABTI).

^۱ Herbicide Resistance Action Committee

(U.S. EPA, 2012). اما مطالعات زیادی روی تاثیر آفت کش ها روی ماهی کپور انجام شده است.

محمد نژاد و همکاران (۱۳۸۹) غلظت کشنده رانداپ را روی بچه ماهی کپور دریایی مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج بدست آمده، سمیت حاد آن ۷۷۱۶ میلی گرم در لیتر محاسبه گردید. جعفری نژاد و همکاران، در سال ۱۳۹۳ غلظت های ۴ و ۸ میکروگرم در لیتر سم فن پروپاترین روی ماهی کپور معمولی را بررسی و پس از گذشت ۹۶ ساعت هیچ تلفاتی مشاهده نکردند ولی در غلظت ۱۲ میکروگرم در لیتر، ۲۵ درصد ماهی ها تلف شدند و در غلظت ۱۶ و ۲۰ میکروگرم در لیتر ۵۰ درصد آنها از بین رفتند. همچنین در مطالعه شیری و همکاران (۱۳۹۳) میزان سمیت کشنده سم مالاتیون بعد از ۹۶ ساعت برای ماهی کپور دریایی ۱/۳ میلی گرم در لیتر به دست آمد. Neskovic و همکاران (۱۹۹۳) سمیت آترازین بعد از ۹۶ ساعت را برای ماهی کپور معمولی ۱۸/۸ میلی گرم در لیتر به دست آوردند.

Saravanan و همکاران (۲۰۱۷)، تاثیر غلظت های مختلف بوتاکلر و علف کش اکسادiazon را روی پاسخ کپور معمولی مورد مطالعه قرار دادند بر اساس این مطالعه تیمارهای ۰/۵، ۵ و ۵۰ میکروگرم در لیتر از این علف کش ها در مدت ۹۶ ساعت باعث افزایش تعداد گلبول های سفید، سدیم، کلر، گلوکز، کلسترول و تری گلیسیرید سرم خون نسبت به گروه کنترل گردید.

۴-۹-۲- سمیت مزمن

۴-۹-۲-۱- فاکتورهای بیوشیمیایی خون

مطالعات خون شناسی به عنوان یکی از ابزارهای تشخیصی در ارائه اطلاعات در مورد سمی بودن آفت کش ها می باشند (Grant, 2015). کاهش مقادیر Hb، Hct و RBC نشان دهنده واکنش دفاعی نسبت به آفت کش ها و کم خونی نوع ماکروسیتیک در ماهی های تحت مواجهه با آفت کش ها می باشد (Narra, 2016). براساس نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، میزان هموگلوبین، تعداد گلبول های سفید شمارش شده، درصد همتوکریت و تعداد گلبول های قرمز در تیمار ۳ که در آن ماهیان تحت تاثیر ۲ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادiazon قرار گرفته بودند، کم تر از شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی بود. ولی اختلاف معنی داری با تیمارهای مختلف و شاهد نشان دادند ($P < 0/05$). همچنین در مطالعات مشابهی کاهش مقادیر Hb، Hct و RBC در ماهی کپور معمولی در مواجهه با ایزوپروتیولان (isoprothiolane) (Saravanan et al., 2017)، آترازین (atrazine) (Ramesh et al., 2009) علف کش مبتنی بر گلای فسفات (glyphosate-based)، غلامی سید کولایی و همکاران، ۲۰۱۳) و فورادان (furadan) (Ramesh et al., 2015) مشاهده شد. WBC در عملکردهای ایمنی بدن در برابر بیماری های عفونی و ذرات خارجی در موجودات مختلف از جمله ماهی ها

نقش دارند. پروفایل‌های بیوشیمیایی خون ماهی، به عنوان شاخص‌های مهم وضعیت زیست محیطی موجود در موجودات زنده ی در معرض آلودگی‌های محیطی استفاده می‌شود.

علاوه بر فاکتورهای ذکر شده، میزان گلوکز نیز در تیمار شاهد بیشتر از تیمارهای آزمایشی بود. در دوره دوم نیز همین نتیجه به دست آمد و تیمار شاهد اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0/05$). در انتهای دوره سوم تیمار ۳ که در آن ماهیان تحت تاثیر ۲ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادیازون قرار گرفته بودند و در تیمار شاهد میزان گلوکز بالاتر بود، این دو تیمار اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان دادند ($P < 0/05$). کمترین میزان این پارامتر نیز در تیمار ۱ به دست آمد. با این حال، تمام غلظت‌های اکسادیازون، یک پاسخ هیپوگلیسمی در ماهی کپور معمولی ایجاد کردند. کاهش سطح گلوکز خون در گروه‌های قرار گرفته در تراکم‌های مختلف اکسادیازون، به علت نیازهای متابولیک اندام‌های حیاتی (مغز، غدد و عضلات) می‌باشد، به همین دلیل میزان گلوکز مصرف شده در سطح خون ماهیان تحت تاثیر استرس سموم پایین آمده بود (Barton, 2002). از طرف دیگر تغییرات میزان گلوکز در خون نشان دهنده اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها است و علت آن اختلال در افزایش گلیکوژن کبدی می‌باشد (Suvetha et al., 2015).

بر اساس نتایج حاصله در این بررسی، میزان پروتئین کل و آلبومین (alb) در تیمار شاهد بیشتر از تیمارهای آزمایشی بود. در دوره دوم و سوم نیز همین نتیجه به دست آمد و تیمار شاهد از لحاظ بالاترین مقدار پروتئین کل، اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0/05$). بررسی میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین معمولاً برای ارزیابی اختلالات مختلف مانند آسیب‌های کبدی (Banaee et al., 2011) و اثر سرکوب کننده سیستم ایمنی به وسیله آفت کش‌ها (Nayak et al., 2004). استفاده می‌شود. علاوه بر این، تخریب بافتی سلولهای کبدی در شرایط استرس مهم ترین عامل کاهش سنتز پروتئین، آلبومین و گلوبولین توسط کبد می‌باشند (Gokcimen et al., 2007). میزان کلسترول نیز در تیمار ۲ که در آن ماهیان تحت تاثیر ۱/۵ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادیازون قرار گرفته بودند، بیشتر از شاهد و تیمارهای آزمایشی بود. به طور معمول، کلسترول نقش مهمی در متابولیسم بدن دارد. بسیاری از محققان به وضوح گزارش داده اند که تغییرات میزان سطوح کلسترول سرم خون به عنوان نشانه ای از اختلال عملکرد کبدی در ماهی می‌باشد (Banaee et al., 2011).

آنزیم‌های کبدی نیز بیشترین میزان آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و میزان آنزیم اسپاراتات ترانس آمیناز (AST) در تیمار شاهد که در آن هیچ گونه علف کشی به کار نرفته بود، کمتر از سایر تیمارهای آزمایشی بود و این تیمار اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0/05$). میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) هم در دوره اول آزمایشی، در تیمار ۱ که در آن ماهیان تحت تاثیر ۱ میلی گرم در لیتر علف کش اکسادیازون قرار گرفته بودند، بیشتر از سایر تیمارهای آزمایشی بود و این تیمار اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد

($P < 0.05$). در دوره دوم نیز همین نتیجه به دست آمد و این تیمار از لحاظ بیشترین میزان آلکالین فسفاتاز (ALP)، اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0.05$). در انتهای دوره سوم نتیجه متفاوتی به دست آمد و میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در تیمار ۱ به شدت افت کرد و این تیمار کمترین میزان این آنزیم را در انتهای دوره دارا بود. سایر تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند ($P < 0.05$). آنزیم آلکالین فسفاتاز یک مارکر مهم در کبد است که نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای مختلف متابولیسم دارد (Speit and Hartmann, 1999) و همچنین در تشخیص اختلال عملکرد کبد و سلامت غشای سلولی نقش دارد (Banaee et al., 2011). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که غلظت‌های بالاتر اکسادیازون به بافت‌های کبدی آسیب می‌رساند (نکروز کبد) که باعث تولید سطح بالایی از فعالیت این آنزیم می‌شود، زیرا کبد عامل اصلی هدف در ماهی برای سمیت اکسادیازون است. همچنین گزارش‌های زیادی در مورد تاثیر علف کش‌ها روی آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در ماهی کپور وجود دارد مانند علف کش آترازین (Blahova et al., 2014) همچنین تاثیر فن والرات fenvalerate روی ماهی راهو *Labeo rohita* براساس نتایج این مطالعات افزایش قابل توجهی در فعالیت ALP دیده شد که با یافته‌های ما همخوانی دارد (Prusty et al., 2011).

۴-۹-۲-۲- هیستوپاتولوژی

حضور آفت کش‌ها به خصوص علف کش‌ها و مواد حاصله از آنها در محیط‌های آبی مشکلات زیستی زیادی را برای آبزیان به وجود می‌آورد. قرار گرفتن ماهی‌ها در غلظت‌هایی از سمیت حاد این مواد، درک بهتری از میزان خطرناک بودن آنها را فراهم می‌آورد. ارزیابی زیست محیطی در غلظت‌های پایین (سمیت مزمن) نیز موجب شناخت بهتر این مواد می‌شود. در مطالعات سم شناسی آفت کش‌ها، معمولاً از تست‌های حاد استفاده می‌شود تا اثرات مخرب آفت کش‌ها روی موجودات سنجیده شود. آبخش ماهی‌ها اولین محل برای تبادل گازها، تنظیم اسمزی، تنظیم اسید-باز و ترشح مواد می‌باشد (Evans, 1987, 2005; Brauner and Rombough, 2012). آبخش‌ها در تماس مستقیم با عوامل خارجی و آسیب‌زا می‌باشند بر همین اساس به عنوان شاخصه زیستی برای سنجش آلودگی آب در نظر گرفته می‌شوند (Bernet et al., 1999).

الف: آبخش‌ها

طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش، بیشترین آسیب بافت آبخش ماهی کپور دریایی خزر طی دوره ۳۰ روزه، در تیمار سم اکسادیازون با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر در روز ۳۰ نمونه برداری مشاهده شد که شامل هایپرپلازی سلولهای اپیتلیوم لاملای ثانویه و نفوذ سلولهای التهابی و نکروز آنها بود، به طوری که حتی بعضی از لاملاهای ثانویه آبخش دچار تخریب شده بودند و فقط تجمعاتی از نفوذ سلولهای التهابی و ضایعات

سلولهای مرده روی لاملای اولیه دیده شد. کمیته مقاومت در برابر علف کش ها (HRAC)^۱ اکسادiazon را در گروه E قرار داده است. این علف کش پروتئوپورفینین IX اکسیداز (PROTOX) را مهار می کند که آخرین آنزیم رایج در سنتز کلروفیل می باشد (Stephenson and Solomon, 2007). مسیر بیوسنتز پورفیرین در اکثر موجودات زنده مهم است. ساده ترین شکل پورفیرین، پورفین است. شناخته ترین پورفیرین ها، مولکول هم است که با یک اتم مرکزی آهن، تشکیل دهنده ساختار هموگلوبین است. بر همین اساس علف کش اکسادiazon از یک سو با از بین بردن بافت آبششی و از طرف دیگر با جلوگیری از تشکیل ساختار هموگلوبین باعث اختلال در تنفس و مرگ ماهی ها می شود (AL-SABTI U.S. EPA, 2012).

Nascimento و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه ای روی ماهیان *Hypostomus*، *Oligosarcus hepsetus* و *auroguttatus* و *Geophagus brasiliensis* در رودخانه ای واقع در جنوب شرقی برزیل، به بررسی آسیب شناسی بافت آبشش این ماهیان پرداختند. بیشترین آسیب مشاهده شده در آبشش، نفوذ لکوسیته و آنوریسیم (پر خونی) بود که از جمله آسیب های غیر قابل برگشت و مختل کننده فعالیت های طبیعی آبشش می باشند (Nascimento et al, 2012). نتایج این بررسی با پژوهش حاضر مشابهت دارد به صورتیکه در ۱۰ روز اول در تیمارهای ۱ میلی گرم در لیتر و ۱/۵ میلی گرم در لیتر نفوذ لکوسیته دیده شد. همچنین در تیمار ۲ میلی گرم در لیتر آنوریسیم مشاهده شد که طی ۳۰ روز آزمایش آسیب های وارد شده هیچ گونه ترمیمی نداشته و بیشتر نیز شده بودند. همچنین سلیمانی و همکاران (۱۳۹۱) در مطالعه ای به بررسی آسیب شناسی بافت آبشش ماهی بیاچ (*Liza abu*) تحت تأثیر آلودگی خور موسی پرداختند. بر اساس نتایج به دست آمده، تغییرات بافتی مشاهده شده در آبشش شامل هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول های اپیتلیومی، ادم تیغه ای و چسبندگی تیغه ها بود. نتایج به دست آمده در این بررسی، با مطالعه حاضر مشابهت دارد. همچنین در پژوهشی که توسط پیکان حیرتی و همکاران (۱۳۹۲) صورت گرفت، نتایج اثرات دوزهای مختلف کادمیوم بر شاخص های خونی و ساختار بافت آبشش ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم تا سطح ۶۴ میکروگرم در لیتر بافت آبشش، متحمل تغییرات متعددی همچون هیپرپلازی، هیپرتروفی و ادم سلول های اپیتلیال رشته های آبششی، نکروز رشته ها و تیغه های ثانویه آبششی می گردد. در مطالعه ای Ellif (۲۰۰۶) ماده سمی دلتا مته رین (deltamethrin) روی بافت آبشش کپور معمولی به مدت ۹۶ ساعت در معرض دوزهای ۰/۰۲۹ میلی گرم در لیتر و ۰/۰۴۱ میلی گرم در لیتر قرار دادند براساس نتایج به دست آمده هر دو تیمار، بروز ضایعات جلدی و نکروز آبشش ها، آنوریسیم (پر خونی) در تیغه های ثانویه و هایپرپلازی در بافت اپیتلیال به وضوح قابل مشاهده بود. Erkmen و همکاران (۲۰۱۵) تاثیر دوزهای مختلف سم شیمیایی سیفه نوترین (cyphenothrin) را روی بافت آبشش نوعی ماهی گوپی (*Lepistes reticulatus*) مورد بررسی قرار

^۱ Herbicide Resistance Action Committee

دادند. براساس نتایج بدست آمده، عوارضی مانند ادم یا خیز لایه اپیتلیال تیغه های اولیه، کوتاه شدن تیغه های ثانویه و بروز ضایعات نکروز مانند در این تیغه ها دیده شد. به این ترتیب، نتایج تحقیقات گذشته نشان دادند که بررسی آسیب های بافتی آبشش ابزار مناسبی برای پیش بینی حضور آلاینده ها مانند علف کش ها در محیط آبی بوده و می تواند به عنوان نشانگر زیستی هدف باشد. تغییرات بافتی که در یک ماهی در شرایط نامساعد و استرس به وقوع می پیوندد، در واقع حاصل عملکرد سیستم ایمنی بدن در جهت مقابله برای مبارزه با عوامل بیماریزا تا رسیدن به شرایط مطلوب و آرمانی است. برای مثال ادم یا خیز بافت اپیتلیوم، مسافتی که عوامل بیماریزا تا رسیدن به جریان خون باید طی کنند را افزایش می دهد. (Ellif, 2006).

تغییرات بافتی آبشش، تکثیر سلول ها، ترشح موکوس، جدا شدگی لایه اپیتلیوم، هایپرتروفی و تشکیل واکوئل در جهت جلوگیری از ورود مواد آلاینده از طریق سلول های آبششی به بدن ماهی است. (Fonseca et al., 2016). کشیدگی و چماقی شدن رأس رشته های لاملای ثانویه از اولین آسیب های وارده به بافت آبشش ماهی می باشد که نتایج بدست آمده در این بررسی تاییدکننده این امر است، بطوریکه در تیمار ۱ میلی گرم درلیتر، اولین آسیب وارد شده چماقی شدن رأس رشته های لاملای ثانویه بود. در این حالت لایه اپیتلیوم لاملای ثانویه به صورت ادم در می آید و حضور مواد شیمیایی موجب کاهش سطح مفید آبشش و در نتیجه کاهش تبادل گازی آبشش می شوند (Fonseca, 2016; Sweidan, 2003). یکی از آسیب های شدید هایپریپلازی بافت آبشش می باشد که در این آسیب، تکثیر سلول های مجاور لاملا، کاهش فضای بین لاملاها را به دنبال دارد که با افزایش این روند، حالت جوش خوردگی در بافت آبشش به وجود می آید (Govindasamy et al., 2012). در غلظت های بالای سم اکسادیازون و با افزایش میزان دوره مواجهه، این امر به وضوح دیده شد. بر همین اساس می توان از آسیب های بافتی آبشش به عنوان سیستمی جهت تشخیص آلودگی آب و نشانگر زیستی مناسب استفاده کرد (Fonseca et al, 2016). براساس نتایج به دست آمده، غلظت های مختلف اکسادیازون سبب تغییرات و آسیب های بافتی شدید در آبشش ماهی کپور دریایی شده و باعث اختلال در تنفس بهم خوردن تعادل اسمزی و اختلال در تنظیم یون ها می شود. حضور غلظت های کمی از این علف کش ها حتی در حد میلی گرم در لیتر باعث آسیب های غیر قابل بازگشت در طول دوره ۳۰ روزه شده و حتی می تواند باعث مرگ ماهی شود.

افزایش تعداد بررسی ها روی بیومارکرهای هیستوپاتولوژیک به این مفهوم است که آن ها سلامت ماهی را واقعی تر از نشانگرهای زیستی بیوشیمیایی نشان می دهند. (Au, 2004). قرار گرفتن در معرض مواد سمی باعث تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت آبشش و کبد ماهی می شود و ممکن است شدت ضایعات تحت تأثیر توزیع انباشتگی در بافت ها باشد (Bernet et al., 1999). یکی از مهم ترین مشکلات مطالعات هیستوپاتولوژیک در ماهی، مربوط به نبود اطاعات کافی نسبت به ویژگی آسیب های آلاینده ها می باشد.

ب: کبد

بر اساس نتایج مطالعه حاصله در این بررسی، میزان سمیت حاد علف‌کش اکسادiazon ۰/۶ میلی گرم در لیتر به دست آمد. همچنین این علف‌کش به صورت اختلاف معنی‌داری ($p < 0/05$) باعث کاهش در طول و وزن ماهی کپور معمولی طی دوره سمیت مزمن (۳۰ روز) شد. از آنجا که کبد اندامی مهم برای تنظیم سوخت‌وساز و فعالیت سم‌زدایی در بدن ماهی می‌باشد و همچنین نسبت به حضور آلاینده‌ها بسیار حساس است، علت کاهش رشد را می‌توان در آسیب‌های وارده به کبد دانست.

نتایج پاتولوژی غلظت‌های مختلف سم اکسادiazon روی بافت کبد و آبشش نشان داد که با افزایش غلظت سم بر آسیب‌های بافتی افزوده می‌شود و در انتهای دوره ۳۰ روزه، روند کاملاً مزمن همراه با هایپرپلازی مجاری صفراوی و تشکیل بافت فیروز ایجاد می‌شود. همچنین در بافت آبشش هایپرپلازی سلول‌های اپیتلیوم لاملای ثانویه و نفوذ سلول‌های التهابی و اتصال لاملاهای ثانویه بهم، چماغی شدن لاملاهای ثانویه و خونریزی‌های خفیفی در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر مشاهده شد.

تحقیقات متعددی به بررسی پاسخ آسیب شناسی بافت کبد پس از مواجهه با مواد آلاینده صورت گرفته است. نتایج تغییرات هیستوپاتولوژیک در کبد، آسیب‌های متوسط تا شدید و جبران‌ناپذیری را نشان می‌دهد که ممکن است عملکرد کبد را تحت تأثیر قرار دهد. هیپرتروفی هسته و هپاتوسیت نشان‌دهنده افزایش فعالیت سلولی است، درحالی‌که واکوئل شدن سیتوپلاسمی و تجمع چربی‌ها، تغییرات در عملکرد کبد را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج این پژوهش، تغییر چربی در سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها به صورت واکوئل دیده شد که با نتایج بررسی‌ها دیگر صورت گرفته مشابهت دارد (Shiogiri et al. 2012, Cengiz and Unlu, 2006, Das et al. 2013). در بافت کبد واکوئل‌یزاسیون سیتوپلاسمی، تجمع چربی، هایپرپلازی مجاری صفراوی و تشکیل بافت فیروز حاوی رشته‌های کلاژن و فیبروسیت‌ها مشاهده شد. افزایش متوسطی در اندازه و تعداد مراکز ملانوماکروفاژ در بافت دیده شد که نشان‌دهنده کاهش کارایی کبد می‌باشد که در نهایت این آسیب‌ها باعث مرگ ماهی می‌شوند (Takashima and Hibiya, 1995, Shiogiri et al. 2012). اعتقاد بر این است که تجمع چربی در سلول‌های کبدی مرحله‌ای قبل از نکروز کبدی است (Giari et al. 2007). تغییر شکل در غشاهای سلولی و از بین رفتن هسته اغلب در سلول‌های کبدی مشاهده شد که نشان‌دهنده آغاز نکروز می‌باشد و باعث تغییر عملکرد سلول‌های کبدی است. این امر نشان‌دهنده اثر مستقیم آلاینده در این سلول‌ها می‌باشد (Ribeiro et al. 2002). افزایش مراکز ملانوماکروفاژ، در کبد در این پژوهش دیده شد. مراکز ملانوماکروفاژ به‌طور کلی با ضایعات مهم کبدی، از جمله فرآیندهای دژنراتیو و نکروزی مرتبط است (Pacheco and Santos, 2002).

علائمی همچون تخریب ساختار پارانشیمی کبد، تجزیه و تفکیک هپاتوسیت‌ها، تورم هپاتوسیت‌ها، نکروز مرکزی و پیکنوتیک شدن هسته هپاتوسیت‌ها را در کبد نوعی گربه‌ماهی *Heteropneustes fossilis* قرار گرفته در معرض مالاتیون، مشاهده نمودند. (Salvo et al. 2008) اثرات غلظت تحت حاد آندوسولفان روی تغییرات هیستولوژیک ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده شاخص کبدی و وزن کبد در تیمار سم $0/001$ میلی گرم در لیتر مقادیر کمتری را نسبت به گروه کنترل نشان داد، علاوه بر این در هیستوپاتولوژی، تغییر ساختاری کبد و واکوئله شدن هپاتوسیت‌ها و نکروزه شدن مشاهده شد.

(Shiogiri et al., 2012) سمیت حاد علف‌کش رانداپ را روی مورفولوژی آبشش، کبد و زنده ماندن ماهی پاکو (*Piaractus mesopotamicus*) بررسی نمودند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده میزان LC50 پس از 48 ساعت، برای این سم $3/74 \pm 0/2$ میلی گرم در لیتر به دست آمد. همچنین نتایج هیستوپاتولوژی بافت آبشش به‌صورت غیر قابل‌باوری نرمال بوده و عملکرد تبادل یونی و آنزیمی تغییر نکرده بود اما بافت کبد واکوئولیزاسیون سیتوپلاسمی، تجمع چربی، تغییرات غشای هسته و سلول و تخلیه گلیکوژن دیده شد که نشان‌دهنده کاهش کارایی کبد است که در نهایت این آسیب‌ها باعث مرگ ماهی می‌شوند. همچنین (Fanta et al. 2003) تورم، نکروز مرکزی، آتروپی و واکوئله شدن را در کبد ماهی کوریدوراس (*Corydoras paleatus*) قرار گرفته در معرض متیل پاراشین، گزارش نمودند. (Sarkar et al. 2005) تأثیر آفت‌کش سایپرترین روی ماهی راهو (*Labeo rohita*) را مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس نتایج بافت‌شناسی کبد، هیپرپلازی، واکوئله شدن، رگ‌های خونی از هم پاشیده شده، هپاتوسیت تخریب‌شده و نکروز مرکزی گزارش شد. (Cengiz and Unlu, 2006) بافت کبدی ماهی گامبوزیا (*Gambusia affinis*) را که در معرض دلتامترین قرار داشت، مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده زخم‌های کبدی، هیپرتروفی هپاتوسیت‌ها، افزایش سلول‌های کاپفر، نکروز مرکزی، تخریب چربی و پیکنوزیس هسته مشاهده شد.

بر اساس نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر، سیتوپلاسم ائوزینوفیلیک، هسته پیکنوزه بازوفیلیک و نفوذ سلول‌های التهابی تک‌هسته‌ای در غلظت‌های مختلف سم اکسادیازون روی بافت کبد دیده شد که حضور دژنراسیون سلول‌های کبدی ائوزینوفیلی در کبد‌های آسیب‌دیده یکی از شواهد تغییر بافتی کبد است. (Koehler et al. 2004) با بررسی کفشک ماهی آلوده‌شده با PCB این نتیجه حاصل شد که اجسام ائوزینوفیلی در کبد و کلیه تحت تأثیر مواد زنبیوتیک فعالیت متابولیکی در سلول‌های پیش نئوپلاستی ائوزینوفیلی کبدی افزایش می‌یابد (Camargo and Matinez, 2007; Van Dyl et al. 2007).

هجوم ماکروفاژها برای از بین بردن ترکیبات خارجی می‌تواند سبب ایجاد اتساع و تورم فضای بین هیاتوسیت‌ها شود. درمجموع رخداد چنین تغییراتی در ساختار معمول سلول‌های کبدی می‌تواند فعالیت طبیعی کبد در متابولیسم نمودن مواد غذایی و تولید آنزیم‌ها و ترکیبات ضروری بدن را مختل سازد (Dutta et al. 1993).

۴-۹-۲-۳- سنجش تخریب DNA

بطور کلی دو پدیده ترمیم و پیشگیری می‌توانند سبب کاهش سطح آسیب‌ها با گذشت زمان شوند. اگر چه مکانیسم ترمیم DNA در ماهی به اندازه‌ای که در پستانداران بررسی شده است، مورد مطالعه قرار نگرفته است ولی به هر حال این رابطه معکوس بین زمان مواجهه و آسیب DNA ممکن است به خاطر مسمومیت با آلاینده‌هایی باشد که می‌تواند فرآیندهای آنزیمی ترمیمی مرتبط با آسیب DNA را ایجاد کنند. به عنوان مثال گزارش شده است که در گلبول‌های قرمز تیلاپای موزامبیک تحت تیمار با آفت کش Monocrotophos، حداکثر افزایش طول متوسط دنباله کامت در یک روز بعد از مواجهه با سم بوده و کاهش در این میزان طی ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه رخ داده است (Saleha Banu et al., 2001)، بعلاوه با گذشت ۹۶ ساعت، مقادیر آسیب در تمام غلظت‌های مورد آزمون به سطح کنترل برگشته بود، که نشان دهنده ترمیم DNA آسیب دیده و یا حذف سلول‌های به شدت آسیب دیده است. دلیل دیگر می‌تواند فعال شدن ژن آنزیم‌های سوخت و سازی از جمله سیتوکروم P-۴۵۰ در بافت‌های مختلفی که مکانیسم دفاعی را در برابر آلاینده‌ها فراهم می‌کند باشد. موجودات زنده به زنجیره‌ای از آنزیم‌های مستقل برای مقابله با عملکردهای سمی مواد ژنوتوکسیک مجهز شده‌اند، در این زنجیره آنزیمی، گلوتاتیون (GSH) و آنزیم‌های وابسته به گلوتاتیون از جمله سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، عمده ترین آنزیم‌های درگیر در از بین بردن مواد سمی تشکیل شده در طول فعال شدن زیستی مواد ژنوتوکسیک هستند و به عنوان اولین مکانیسم دفاعی در مقابل استرس اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود. ترکیب و پیوستگی این آنزیم‌ها با مواد ژنوتوکسیک مانع از اتصال آزادانه این مواد با DNA، RNA یا پروتئین‌های سلول شده و در نتیجه از اثرات آنها جلوگیری می‌کند (بنایی، ۱۳۸۹).

براساس نتایج این پژوهش تیمار ماهی‌های در معرض سم اکسادیازون افزایش تخریب معنی‌داری نسبت به ماهی‌های تیمار شاهد بدون سم داشتند. اثر سم و غلظت‌های متفاوت آن بر میزان بروز سطح تخریب DNA گلبول‌های قرمز معنی‌دار بود. همچنین روند افزایش معنی‌دار سطح تخریب DNA در گلبول‌های قرمز ماهیان تحت تیمار علف کش اکسادیازون، با توجه به غلظت‌های سم در بین بعضی از تیمارها مشهود بود، به نوعی که بیشترین میزان تخریب در غلظت تحت کشنده ۲ میلی گرم در لیتر (۲۸/۴٪) و سپس بترتیب در غلظت های ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر (۲۱/۳٪ و ۲۲/۹٪) مشاهده شد. در مورد تاثیر آفت کش‌ها روی شکست DNA ماهی‌ها مطالعاتی صورت گرفته است مانند مطالعه علی دوست و همکاران، (۱۳۹۶) اثر مالاتیون روی کپور معمولی مورد بررسی قرار دادند براساس نتایج این مطالعه مالاتیون باعث شکست DNA می‌شود، همچنین

Buschini و همکاران در سال ۲۰۰۴ از سنجش‌های کامت و ریز هسته برای ارزیابی سلامت DNA گلبول قرمز ماهی کپور معمولی تحت تاثیر هیپوکلریت سدیم، دی اکسید کلر استفاده کردند. طبق نتایج گزارش شده پس از سه ساعت از شروع آزمایش، افزایش در شکستگی‌های DNA قابل تشخیص بود که نشان داد آسیب DNA به‌طور مستقیم در گلبول‌های قرمز نقش دارد. Çavaş و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای اثرات ژنوتوکسیک علف‌کش glyphosate را روی ماهی طلایی (*Carassius auratus*) به‌صورت آزمایشگاهی ارزیابی نمودند. ماهیان در معرض سه غلظت ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر از این علف‌کش قرار گرفتند. نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار وابسته به غلظت تعداد ریز هسته و سطح شکستگی‌های رشته‌ای DNA بود.

Zhu و همکاران تاثیرات علف‌کش atrazine^۱ را بر آسیب DNA ماهی گورخری (*Danio rerio*) مورد بررسی قرار دادند. نتایج سنجش کامت در غلظت‌های مختلف در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری یافت. بعلاوه افزایش در آسیب DNA با میزان ROS ناشی از تنش اکسیداتیو مطابقت داشت.

Nwani و همکاران در سال ۲۰۱۱، اثرات ژنوتوکسیک و موتاژنیک علف‌کش atrazine را در ماهی *Channa punctatus* توسط سنجش‌های ریز هسته و کامت مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج بدست آمده، بیشترین میزان آسیب DNA در تمامی غلظت‌ها در روز پنجم بود که در ادامه با کاهش تدریجی غیر خطی همراه بود که احتمالاً بعلت فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی و سیستم‌های ترمیم DNA در بافت‌ها و یا از بین رفتن سلول‌های با آسیب زیاد بود.

Nataraj و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر غلظت‌های مختلف آفت‌کش ارگانوفسفره پروفنفسوس را روی سمیت ژنتیکی ماهی کپور هندی روهو (*Labeo rohita*) مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج تخریب DNA به روش کامت، آسیب DNA در گلبول‌های قرمز به‌صورت وابسته به غلظت و زمان افزایش یافته بود. Shugart و همکاران (۱۹۹۰) در بررسی‌های آزمایشگاهی، افزایش شکستگی‌های DNA در کپور سرگنده و خورشید ماهی آبشش آبی را که به صورت مزمن در معرض بنزو پیرین موجود در آب قرار گرفته بودند شناسایی کردند. در کلیه مطالعات صورت گرفته میزان آسیب‌ها با افزایش غلظت افزایش یافت و بیشترین آسیب وارده در ساعات اولیه مواجهه با سم بودند، همچنین بر اساس نوع سم و گونه ماهی، نتایج مختلف در مطالعات به دست آمد. این ترکیبات سمی به علت خاصیت ژنوتوکسیک خود می‌توانند با اتصال به رشته DNA موجب شکستگی تک رشته و یا دو رشته‌ای مولکول DNA شوند (Frenzilli et al., 2000). همچنین رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) ناشی از آن‌ها می‌توانند با اکسید کردن ترکیبات ساختاری DNA (به‌ویژه بازهای آلی) موجب شکست مولکول DNA شوند (Dogan et al., 2011, Peña-Llopis et al., 2003).

^۱ (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1, 3, 5-triazine)

برای مثال کربوسولفان با تولید گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) سبب آسیب اکسیداتیو در ارگانسیم‌های آبی می‌شود (Risso-de Faverney et al., 2001) که رابطه مستقیمی با سطح قطعه‌قطعه شدن DNA دارد (Kadirvel et al., 2009, Lafarga-De la Cruz et al., 2008). بسیاری از مواد شیمیایی سمی سبب شکستگی‌های رشته‌ای مستقیم یا غیر مستقیم در DNA می‌شوند که از طریق ارزیابی‌های COMET می‌توانند افزایش مقدار شکستگی‌ها را که نتیجه‌ای از در معرض قرار گرفتن در برابر این مواد شیمیایی است برآورد کنند.

فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات

۲-۱- نتیجه گیری کلی

براساس نتایج پژوهش حاضر میزان حد کشنده ی ۵۰ درصد در ۹۶ ساعت (LC50 96h) علف کش اکسادiazon ۳/۹ میلی گرم در لیتر بدست آمد همچنین در سمیت مزمن، این سم موجب تحریک عصبی، پرخونی آبشش ها و افزایش موکوس شد و کم ترین میزان رشد و افزایش وزن در گروه ۲ میلی گرم در لیتر این سم دیده شد. در مورد فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهیان تحت تیمار با افزایش دوز و مدت زمان مواجهه، میزان آنزیم های کبدی افزایش یافت که نشان دهنده آسیب به بافت کبد بود سپس با افزایش طول دوره شاهد کاهش سطح آنزیم ها بودیم. همچنین علف کش اکسادiazon با از بین بردن گلبول های قرمز موجب کم خونی شدید در ماهی ها شد. نتایج هیستوپاتولوژی مقاطع بافتی گروه تیمار دوز ۲ میلی گرم در لیتر از سم اکسادiazon، در ۱۰ روز اول جراحات حاد و شدیدی از قبیل نکروز و نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای به ویژه در آبشش ها دیده شد که در پایان ۲۰ روز از مسمومیت، جراحات به مراتب نسبت به ۱۰ روز اول بیشتر بوده به طوری که در پایان دوره ۳۰ روزه، روند جراحات مزمن بود که در بافت کبد با نفوذ بافت فیروز و هایپرپلازی مجاری صفراوی دیده شد و در بافت طحال نیز افزایش شدید در تعداد و سایز مراکز ملانوماکروفاژ مشاهده شد. البته ناگفته نماند که با افزایش در تعداد روزهای در معرض قرارگیری، شدیدترین جراحات در بافت آبشش و متعاقباً در بافت کلیه مشاهده گردید. پژوهش حاضر به وضوح نشان داد که سم اکسادiazon در تمام غلظت های تحت کشنده مورد بررسی بر میزان آسیب DNA سلول های بافت ماهی کپور دریایی تاثیر معنی دار داشته است و لذا فرض پتانسیل ژنوتوکسیک سم اکسادiazon مورد تایید قرار می گیرد .

براساس نتایج به دست آمده، غلظت های مختلف اکسادiazon سبب تغییرات و آسیب های بافتی شدید در ماهی کپور دریایی می شود باعث اختلال در تنفس بهم خوردن تعادل اسمزی و اختلال در تنظیم یون ها می شود. به طور کلی حضور غلظت های کمی از این علف کش حتی در حد میلی گرم در لیتر باعث آسیب های غیر قابل بازگشت در طول دوره ۳۰ روزه شده و حتی می تواند باعث مرگ ماهی کپور دریایی شود.

۲-۲- پیشنهادات

- ۱- بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف اکسادیازون روی سنین مختلف ماهی کپور وحشی دریایی خزر
- ۲- بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف اکسادیازون روی سیستم عصبی ماهی کپور وحشی دریایی خزر
- ۳- بررسی تاثیر علف کش اکسادیازون روی سایر گونه های اقتصادی
- ۴- بررسی تاثیر علف کش اکسادیازون در بازه زمانی بیشتر از ۳۰ روز روی ماهی کپور دریای خزر
- ۵- بررسی میزان ماندگاری علف کش اکسادیازون در بافت عضله ، جهت مصارف انسانی

فهرست منابع فارسی

- آقا نباتی علی ، زمین شناسی ایران ، انتشارات سازمان زمین شناسی کشور، بهار ۸۳
- بنایی ، م ۱۳۸۹. تاثیر سیلی مارین در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از سمیت زیر کشنده دیازینون در ماهی قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، رساله دکتری شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران.
- تبرایی هادی، ارزیابی LC₅₀ و توکسیکوکیتیک اسانس زیره سیاه در ماهی قزل آلی رنگین کمان پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ۱۳۹۴
- جعفری نژاد، م .، م . عسگری حصنی،، ا . کریمی،، ن . بیوکی و م . معتمدی، ۱۳۹۳. تاثیر غلظت های تحت کشنده حشره کش فن پروپاترین بر سدیم، پتاسیم سرم ماهی کپور (*Cyprinus carpio*). مجله فیزیولوژی بیوتکنولوژی آبزیان، ۳(۲).
- سلیمانی ، ز .، سلامات، ن.، ع . صفاهیه .، الف ، سواری و م ، رونق. بررسی آسیب شناسی آبشش ماهی بیاچ (Liza Abu) تحت تاثیر آلودگی آب خور موسی مجله پاتوبیولوژی مقایسه ای دوره ۹، شماره ۲ (پیاپی ۳۷)، تابستان ۱۳۹۱، صفحه ۶۶۵-۶۷
- شیری، ن .، خ ، خوشنودی فر و ع ، میرواقفی. تعیین درجه سمیت مالاتیون و بررسی اثر آن روی برخی شاخص های خونی بچه کپور معمولی دریای خزر. (*Cyprinus carpio*)
- صفوی، ب .، ه . جوانشیر و س . ایگدري، ۱۳۹۵. تاثیر غلظت های مختلف سم سایپرمترین بر بافت آبشش سیاه ماهی (*Valenciennes capota damascina*). نشریه علمی بوم شناسی آبزیان، ۵(۴): ۸۸-۹۵.
- عروجعلی ، الف .، پ ، حیرتی .، س ، درافشان و ن ، محبوبی، ۱۳۹۴. اثر غلظت های تحت کشنده کادمیوم بر برخی تغییرات بافتی در آبشش بچه تاس ماهی استرلیاد پرورشی (*Acipenser ruthenus*). مجله علمی شیلات / ایران، ۲۲ (۴)، pp. 71-81.
- علی دوست سلیمی، پ .، ح ، مزدارانی .، ع ، ماشینچیان مرادی .، و پ ، قوام مصطفوی، ۱۳۹۱، بررسی سمیت ژنتیکی حشره کش مالاتیون در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با استفاده از روش کامت قلیایی، دوازدهمین کنگره ژنتیک / ایران، تهران، انجمن ژنتیک ایران
- فاضلی م ، ش .، ب ، ابطحی .، و الف ، صباغ کاشانی ، ۱۳۹۴ سنجش تجمع فلزات سنگین سرب، نیکل و روی در بافتهای ماهی کفال (*Liza aurata*) سواحل جنوبی دریای خزر. مجله علمی شیلات ایران (فارسی)، دوره ۱۴، شماره ۱، از صفحه ۶۵ تا صفحه ۷۸

فرخی ، ف.، ش.، جمیلی.، م.، شهیدی.، ع.، ماشینچیان.، غ.، ح.، وثوقی.، ۱۳۹۴. بررسی تاثیر حشره کش مالاتیون بر بافت و آنزیم های کبدی ماهی کلمه دریای خزر. مجله علمی شیلات ، دوره ۲۴ ، شماره

۴

فلاحی کپورچالی، م.، و شمسایی م. تعیین حد مجاز مصرف علف کش دیورون بر روی بقاء *Daphnia magna* فصلنامه علمی ترویجی علوم آبی پروری پیشرفته دوره ۱، تابستان ۱۳۹۶، صفحه ۱-۱۱

گزارشات سازمان جهاد کشاورزی استان گلستان، واحد حفظ نباتات (۱۳۸۲).

محمد نژاد شמושکی، م.، ر.عصاره، م. صمدیان و ذ.ا. پژند، ۱۳۸۹. تعیین غلظت کشنده (LC50 96h) علف کش رانداپ (گلایفوزیت) بر روی بچه ماهیان سفید (*Rutilus frisi kutum*)، کلمه (*Rutilus rutilus* *caspicus*) و کپور (*Cyprinus carpio*). علوم زیستی، ۷۹-۸۶: (۱) ۴

- Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A.M. and Ismael, N.E., 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280(1-4), pp.185-189.
- Agius, C. and Roberts, R.J., 1981. Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. *Journal of Fish Biology*, 19(2), pp.161-169.
- Al-Sabti U.S. EPA (2012). 2006–2007 Pesticide Market Estimates: Usage, vol. 2012. Washington, DC:U.D. Environmental Protection Agency.
- Al-Sabti, K. and Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2-3), pp.121-135.
- Ames, B. N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221(4617), 1256-1264.
- Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine pollution bulletin*, 48(9-10), pp.817-834.
- Balon, E.K., 1995. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture*, 129(1-4), pp.3-48.
- Banaee, M., Sureda, A., Zohiery, F., Hagi, B.N. and Garanzini, D.S., 2014. Alterations in biochemical parameters of the freshwater fish, *Alburnus mossulensis*, exposed to sub-lethal concentrations of Fenpropathrin. *International Journal of Aquatic Biology*, 2(2), pp.58-68.
- Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., Ahmadi, K. (2011). Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99: 1-6
- Barton, B.A., 2002. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and comparative biology*, 42(3), pp.517-525.
- Barus, V., Tenora, F., Kracmar, S. and Prokes, M., 2001. Accumulation of heavy metals in the *Ligula intestinalis* plerocercoids (Pseudophyllidea) of different age. *Helminthologia*, 38(1), pp.29-33.
- Berg, E.A., 1948. A simple objective technique for measuring flexibility in thinking. *The Journal of general psychology*, 39(1), pp.15-22.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. and Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish diseases*, 22(1), pp.25-34.
- Blahova, J., Modra, H., Sevcikova, M., Marsalek, P., Zelnickova, L., Skoric, M. and Svobodova, Z., 2014. Evaluation of biochemical, haematological, and histopathological responses and recovery ability of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after acute exposure to atrazine herbicide. *BioMed research international*, 2014.
- Blasiak, J., Jalszynski, P., Trzeciak, A., Szyfter, K. (1999). In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 445: 275-283.
- Brauner, C.J. and Rombough, P.J., 2012. Ontogeny and paleophysiology of the gill: new insights from larval and air-breathing fish. *Respiratory physiology & neurobiology*, 184(3), pp.293-300.

- Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, A., Rizzoni, M. (2004). Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 557: 119-129.
- Camargo, M. M. and Martinez, C. B. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical ichthyology*, 5(3): 327-336.
- Candioti, J.V., S. Soloneski and M.L. Larramendy, 2010. Genotoxic and cytotoxic effects of the formulated insecticide Aficida® on *Cnesterodon decemmaculatus* Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 703(2): pp.180-186.
- Cavalcante, D.G.S.M., C.B.R.Martinez and S.H.Sofia, 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 655(1): pp.41-46.
- Çavaş, T., Könen, S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22: 263-268.
- Cengiz, E.I. and Unlu, E., 2006. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: a microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21(3), pp.246-253.
- Chang, P.S., Chen, H.C. and Wang, Y.C., 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture*, 164(1-4), pp.233-242.
- Chowdhury, A., M.Haq, 2013. Alteration of haematological parameters of "zeol fish"-*Clarias batrachus* exposed to malathion. *Bangladesh Journal of Zoology*, 40(2): pp.183-188.
- Colovic, M., Krstic, D., Petrovic, S., Leskovac, A., Joksic, G., Savic, J., Franko, M., Trebse, P., Vasic, V. (2010). Toxic effects of diazinon and its photodegradation products. *Toxicology letters*, 193: 9-18.
- Comoretto, L., Arfib, B., Chiron, S., 2007. Pesticides in the Rhône river delta (France): basic data for a field-based exposure assessment. *Sci. Total Environ.* 380, 124–132.
- Couillard, C.M., Gagnon, P., Hodson, P.V. and Dodson, J.J., 1995. Lesions and parasites in white suckers, *Catostomus commersoni*, in bleached-kraft pulp mill-contaminated and reference rivers. *Environmental toxicology and chemistry*, 14(6), pp.1051-1060.
- Das, A., Nakhro, K., Chowdhury, S. and Kamilya, D., 2013. Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquifaciens* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). *Fish & shellfish immunology*, 35(5), pp.1547-1553.
- Deka, S. and Mahanta, R., 2012. A study on the effect of organophosphorus pesticide malathion on hepato-renal and reproductive organs of *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Science*, 1(1).
- Devaux, A., Fiat, L., Gillet, C., Bony, S. (2010). Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquatic Toxicology*.
- Devine, M. D., Duke, S. O. and Fedtke, C. (1993). *Physiology of Herbicide Action*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8: 1103-1123.
- DiGiuseppe, J.A., Hunting, D.J., Dresler, S.L. (1990). Aphidicolin-sensitive DNA repair synthesis in human fibroblasts damaged with bleomycin is distinct from UV-induced repair. *Carcinogenesis*, 11: 1021.
- Dogan, D., Can, C., Kocyigit, A., Dikilitas, M., Taskin, A., Bilinc, H. (2011). Dimethoate-induced oxidative stress and DNA damage in *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere*.
- Duke, S. O. and Powles, S. B. (2008). Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. *Pest Manag. Sci.* 64, 319–325.
- Dutta, H.M.; Adhikari, N.K.; Singh, P.K. and Munshi, J.S., 1993. Histopathological changes induced by Malathion in the liver of a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *B. Environ. Contam. Tox.* Vol. 99, pp: 319-100.
- Ellif, I.C., 2006. Gill and kidney histopathology in the fresh water fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental toxicology and Pharmacology*, 22, 200-204.
- Erkmen, B., 2015. Spermiotoxicity and embryotoxicity of permethrin in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 94(4), pp.419-424.
- Evans, D.H., 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 71, p.47.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M. and Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85(1), pp.97-177.
- Fanta, E., Rios, F.S.A., Romão, S., Vianna, A.C.C. and Freiburger, S., 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and environmental safety*, 54(2), pp.119-130.
- Feldman, M.S., 2000. Organizational routines as a source of continuous change. *Organization science*, 11(6), pp.611-629.
- Fonseca, A.R., Fernandes, L.S., Fontainhas-Fernandes, A., Monteiro, S.M. and Pacheco, F.A.L., 2016. From catchment to fish: impact of anthropogenic pressures on gill histopathology. *Science of the Total Environment*, 550, pp.972-986.
- Frenzilli, G., Bosco, E., Barale, R. (2000). Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 468: 93-108.
- Giari, L., Manera, M., Simoni, E. and Dezfili, B.S., 2007. Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. *Chemosphere*, 67(6), pp.1171-1181.
- Gokcimen, A., Gulle, K., Demirin, H., Bayram, D., Kocak, A. and Altuntas, I., 2007. Effects of diazinon at different doses on rat liver and pancreas tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87(2), pp.103-108.
- Govindasamy, R. and Rahuman, A.A., 2012. Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Environmental Sciences*, 24(6), pp.1091-1098.

- Grant, K.R., 2015. Fish hematology and associated disorders. *Vet. Clin. N. Am. Exot. Anim. Pract.* 18 (1), 83–103.
- Harabawy, A.S. and Ibrahim, A.T.A., 2014. Sublethal toxicity of carbofuran pesticide on the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822): hematological, biochemical and cytogenetic response. *Ecotoxicology and environmental safety*, 103, pp.61-67.
- Ivanov, V.P., 2000. Biological resources of the Caspian Sea. *KaspNIRKH, Astrakhan*.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23(3), pp.207-221.
- Kadirvel, G., Kumar, S., Kumaresan, A. (2009). Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Animal reproduction science*, 114: 125-134.
- Karber, G. and Behrens, B., 1964. Statistical methods in biological assays. *Londres: Griffin Ch. An. C.*
- Koehler, A. (2004). The gender-specific risk to liver toxicity and cancer of flounder (*Platichthys*)
- Könnecker, G., Regelman, J., Belanger, S., Gamon, K. and Sedlak, R., 2011. Environmental properties and aquatic hazard assessment of anionic surfactants: physico-chemical, environmental fate and ecotoxicity properties. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(6), pp.1445-1460.
- Koprucu, S.S., Koprucu, K., Ural, M.S., Ispir, U., Pala, M. (2006). Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86: 99-105.
- Lafarga-De la Cruz, F., Valenzuela-Bustamante, M., Dupré, E., del Río-Portilla, M.A. and Gallardo-Escárate, C., 2008. GENOMIC INTEGRITY EVALUATION IN SPERM OF CHOROMYTILUS CHORUSBY COMET ASSAY EVALUACION DE INTEGRIDAD GENOMICA EN ESPERMATOZOIDES DE CHOROMYTILUS CHORUS MEDIANTE ENSAYO COMETA. *Gayana*, 72(1), pp.73-81.
- Lawrence, A.J. and Hemingway, K.L., 2003. Effects of pollution on fish. *UK. P*, pp.144-153.
- Lee, R.F., S. Steinert, 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544(1): pp.43-64.
- Lemly, A.D., 2002. Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: the Belews Lake case example. *Aquat. Toxicol.* 57 (1–2), 39–49.
- Levinson, M. I. (2008). Handbook of Detergents, Part F. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I. and Barton, M.K., 1996. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature*, 379(6560), p.66.
- Mitchelmore, C., Chipman, J. (1998a). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399: 135-147.
- Mitchelmore, C., Chipman, J. (1998b). Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquatic Toxicology*, 41: 161-182.

- Mortensen, D. A., Egan, J. F., Maxwell, B. D., Ryan, M. R. and Smith, R. G. (2012). Navigating a critical juncture for sustainable weed management. *Bioscience* 62, 75–84.
- Narra, M.R., 2016. Single and cartel effect of pesticides on biochemical and haematological status of *Clarias batrachus*: A long-term monitoring. *Chemosphere*, 144, pp.966-974.
- Nascimento, A.A., Araújo, F.G., Gomes, I.D., Mendes, R.M.M. and Sales, A., 2012. Fish gills alterations as potential biomarkers of environmental quality in a eutrophized tropical river in South-Eastern Brazil. *Anatomia, histologia, embryologia*, 41(3), pp.209-216.
- Nataraj, B., Hemalatha, D., Rangasamy, B., Maharajan, K. and Ramesh, M., 2017. Hepatic oxidative stress, genotoxicity and histopathological alteration in fresh water fish *Labeo rohita* exposed to organophosphorus pesticide profenofos. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, pp.185-190.
- Nayak, S., Lee, H., Chmielewski, J. and Lyon, L.A., 2004. Folate-mediated cell targeting and cytotoxicity using thermoresponsive microgels. *Journal of the American Chemical Society*, 126(33), pp.10258-10259.
- Neskovic, N.K., Elezovic, I., Karan, V.E.S.E.L.A., Poleksic, V. and Budimir, M., 1993. Acute and subacute toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 25(2), pp.173-182.
- Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P., Lakra, W.S. (2011). Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, In Press, Corrected Proof.
- OECD (1992). Guideline for the testing of chemicals: (Part 203). Organisation for Economic Co-operation and Development. Adopted by the Council on July 17, 1995., pp.
- Ongley, E.D., 1996. Control of water pollution from agriculture (No. 55). Food & Agriculture Org (FAO), PP.
- Pacheco, M. and Santos, M.A., 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53(3), pp.331-347.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M., Peña, J. (2003). Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*, 65: 337-360.
- Prusty, A.K., Kohli, M.P.S., Sahu, N.P., Pal, A.K., Saharan, N., Mohapatra, S. and Gupta, S.K., 2011. Effect of short term exposure of fenvalerate on biochemical and haematological responses in *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Pesticide biochemistry and physiology*, 100(2), pp.124-129.
- Ramesh, M., Narmadha, S. and Poopal, R.K., 2015. Toxicity of furadan (carbofuran 3% g) in *Cyprinus carpio*: Haematological, biochemical and enzymological alterations and recovery response. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(4), pp.314-326.
- Ramesh, M., Srinivasan, R. and Saravanan, M., 2009. Effect of atrazine (Herbicide) on blood parameters of common carp *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes). *African Journal of Environmental Science and Technology*, 3(12).
- Ribeiro, C.O., Schatzmann, M., De Assis, H.S., Silva, P.H., Pelletier, E.M.I.L.I.E.N. and Akaishi, F.M., 2002. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater

- fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51(3), pp.161-167.
- Risso-de Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J., Bailly, B., Rahmani, R. (2001). Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquatic Toxicology*, 53: 65-76.
- Ruchin, A.B., Vechkanov, V.S. and Kuznetsov, V.A., 2002. Growth and feeding intensity of young carp *Cyprinus Carpio* under different constant and variable monochromatic.
- Saleha Banu, B., Danadevi, K., Rahman, M., Ahuja, Y., Kaiser, J. (2001). Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 39: 361-366.
- Salvo, L.M., Sinhorini, I.L., MALUCELLI, B.E., Klemz, C., Sanchez, D.C.O., Nicaretta, L., Malucelli, M.I.C., Bacila, M. and Assis, H.C.S.D., 2008. Effects of endosulfan sublethal concentrations on carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758): Morphometric, histologic, ultrastructural analyses and cholinesterase activity evaluation. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 45(2), pp.87-94.
- Saravanan, S., Chawla, A., Vairamani, M., Sastry, T.P., Subramanian, K.S. and Selvamurugan, N., 2017. Scaffolds containing chitosan, gelatin and graphene oxide for bone tissue regeneration in vitro and in vivo. *International journal of biological macromolecules*, 104, pp.1975-1985.
- Sarkar, B., Chatterjee, A., Adhikari, S. and Ayyappan, S. 2005. Carbofuran-and cypermethrin-induced histopathological alterations in the liver of *Labeo rohita* (Hamilton) and its recovery. *Applied Ichthyology*, 21(2): 131-135.
- Sedwick, W.D., Kutler, M., Brown, O.E. (1981). Antifolate-induced misincorporation of deoxyuridine monophosphate into DNA: inhibition of high molecular weight DNA synthesis in human lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78: 917.
- Sepici-Dinçel, A., A.C.K. Benli, M. Selvi, R. Sarıkaya, D. Şahin, I.A. Özkul and F. Erkoç, 2009. Sublethal Cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio*.) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5): pp.1433-1439.
- Shiogiri, N.S., Paulino, M.G., Carraschi, S.P., Baraldi, F.G., da Cruz, C. and Fernandes, M.N., 2012. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(2), pp.388-396.
- Shugart, L.R., 1990. 5-Methyl deoxycytidine content of DNA from bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) exposed to benzo [a] pyrene. *Environmental toxicology and chemistry*, 9(2), pp.205-208.
- Sikka, H., Rutkowski, J., Kandaswami, C., Kumar, S., Earley, K., Gupta, R. (1990). Formation and persistence of DNA adducts in the liver of brown bullheads exposed to benzo [a]
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), pp.184-191.
- Solomon, K. R. and Thompson, D. G. (2003). Ecological risk assessment for aquatic organisms
- Speit, G. and Hartmann, A., 1999. The comet assay (single-cell gel test). In DNA repair protocols (pp. 203-212). Humana Press.

- Steinert, S.A., Streib-Montee, R., Leather, J.M., Chadwick, D.B. (1998). DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399: 65-85.
- Stephenson, G. R. and Solomon, K. R. (2007). Pesticides and the Environment. Guelph,
- Suvetha, L., Saravanan, M., Hur, J.H., Ramesh, M. and Krishnapriya, K., 2015. Acute and sublethal intoxication of deltamethrin in an Indian major carp, *Labeo rohita*: Hormonal and enzymological responses. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 72, pp.58-65.
- Takashima, F. and Hibiya, T., 1995. An atlas of fish histology: normal and pathological features.
- Tierney, K.B., Farrell, A.P. and Brauner, C.J. eds., 2013. *Fish Physiology: Organic Chemical Toxicology of Fishes* (Vol. 33). Academic Press.
- Van der Oost, R., J. Beyer and N.P. Vermeulen, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2): pp.57-149.
- Van Dyk, J. C., Pieterse, G. M. and Van Vuren, J. H. J. 2007. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(3): 432-440.
- Vazirzadeh, A. and Yelghi, S., 2015. Long-term changes in the biological parameters of wild carp (*Cyprinus carpio carpio*) from the south-eastern Caspian Sea. *Iranian Journal of Science and Technology*, 39(A3), p.391.
- Vazirzadeh, A., Amiri, B.M., Yelghi, S., Hajimoradloo, A., Nematollahi, M.A. and Mylonas, C.C., 2011. Comparison of the effects of different methods of mammalian and salmon GnRHa administration on spawning performance in wild-caught female carp (*Cyprinus carpio carpio*) from the Caspian Sea. *Aquaculture*, 320(1-2), pp.123-128.
- Veith, G. D. and Broderius, S. J. (1990). Rules for distinguishing toxicants that cause Type I
- Velisek, J., Sudova, E., Machova, J. and Svobodova, Z., 2010. Effects of sub-chronic exposure to terbutryn in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(3), pp.384-390.
- Zhu, L., X. Dong, H. Xie, J.Wang, J.Su and C.Yu, 2011. DNA damage and effects on glutathione-S-transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology*, 26(5): pp.480-488.

Abstract :

This study conducted to evaluate the toxic effects of a widely used oxadiazon herbicide, on common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling (15 g). The 96-h LC₅₀ was determined, and the growth performance, serum biochemical and hematological parameters, DNA damage of erythrocytes cells, as well as histopathological changes were also determined in fish exposed to sublethal concentrations (1, 1.5 and 2 ppm) of the herbicide for 30 days. The 96-h LC₅₀ to *C. carpio* was found to be 3.9 ppm. Weight gain (WG), specific growth rate (SGR) and condition factor (CF) were decreased, while food conversion ratio (FCR) increased in the exposed fish groups ($P < 0.05$). Exposure to oxadiazon significantly increased serum ALT (Alanine transaminase), AST (Aspartate transaminase), ALP (Alkaline phosphatase), and glucose levels, while total protein, cholesterol, and albumin were significantly decreased in the exposed fish groups depend on oxadiazon concentrations and exposure time ($P < 0.05$).

Erythrocytes cells of fish exposed to 1, 1.5 and 2 ppm of oxadiazon showed DNA damage (21.3%, 22.9%, and 28.4%, respectively), significantly higher than control group ($p < 0.05$). Moreover, exposure to oxadiazon significantly decreased WBC, RBC, Hb, Hct as well as serum albumin, glucose, and total protein levels, while serum ALP was significantly increased in the exposed fish groups ($P < 0.05$). No significant differences were found in MCV, MCHC and MCH levels between oxadiazon treatments and control groups ($P > 0.05$). Oxadiazon was also induced marked histological changes included hyperemia, hyperplasia of lamellar epithelium, inflammatory cell infiltration, aneurysm, rod-like structures of secondary gill lamellae in the gills; fat changes in the hepatocytes, fibrosis, focal inflammatory cells and fibrocyte aggregation, diffuse and focal necrosis, hyperemia and hemorrhage and bile duct hyperplasia in the liver; hyperemia, necrosis of tubular epithelium and proteinuria in the kidney; myofibril change, necrosis, and inflammatory cell infiltration in the muscles. Changes in size and number of melanomacrophage centers were also observed in the kidney, spleen, and liver tissues of exposed fish. This study indicated that oxadiazon is highly toxic to common carp and exposure to this herbicide lead to adverse effects on the fish.

Keywords: Oxadiazon, carp, 96-h LC₅₀, histopathology, growth performance, biochemical parameters, hematology, DNA damage



ISLAMIC AZAD UNIVERSITY
SCIENCE AND RESEARCH BRANCH
Faculty of Natural Resources and Environment
Department of Marine Biology.
Ph.D. Thesis Marine Biology

Subject:

Effect of Oxadiazon Herbicide on Physiological, Biochemical and
DNA Damage in Common carp (*Cyprinus carpio*)

Thesis Advisor:

Hossein Emadi Ph.D.

Consulting Advisor:

Shahla Jamili Ph.D.

Ali Mashinchian Ph.D.

By:

Seyede Asal Zanjani

Winter 2019